

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Zentrum für Innere Medizin II
(Direktor Prof. Dr. med. W. F. Caspary)

**Pränatale Entwicklung des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoires des Schweins
sowie Untersuchungen zum Einfluß von Mikroorganismen auf das
postnatale $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoire**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von

Wiebke Geisel
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2004

Dekan:

Prof. Dr. med. J. Pfeilschifter

Referent:

Prof. Dr. med. W. F. Caspary

Koreferent:

Prof. Dr. med. W.-H. Boehncke

Tag der mündlichen Prüfung:

30.08.2004

Meiner Familie in großer Dankbarkeit gewidmet

1. Einleitung	1
1.1 Das mukosale Immunsystem	1
1.1.1 Die Lamina epithelialis	2
1.1.2 Die Zusammensetzung der Lamina propria	4
1.1.3 Lymphozytenprägung, -rezirkulation und -homing im Darm.....	4
1.2 $\gamma\delta$ T-Zellen im Vergleich zu $\alpha\beta$ T-Zellen	6
1.2.1 Die Antigenerkennung der $\gamma\delta$ T-Zellen	7
1.2.2 $\gamma\delta$ T-Zellen erhalten epitheliale Integrität.....	8
1.2.3 Die Rolle der $\gamma\delta$ T-Zellen im System der Immunabwehr	8
1.2.4 Die Rolle der $\gamma\delta$ T-Zellen in Bezug auf Krankheit.....	9
1.3 Der $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor.....	11
1.3.1 Die Struktur des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptors	11
1.3.2 Genetische Organisation	13
1.3.3 Entstehung funktioneller $\gamma\delta$ -Ketten mittels Rekombination.....	13
1.4 Entwicklung der $\gamma\delta$ T-Zellen beim Menschen.....	15
1.4.1 Pränatale Entwicklung der $\gamma\delta$ T-Zellen und des fetalen T-Zell-Rezeptor-Repertoires	15
1.4.2 Funktion der $\gamma\delta$ T-Zellen während dem fetalen Leben	16
1.4.3 Postnatale Entwicklungsveränderungen des $\gamma\delta$ T-Zell- Rezeptor-Repertoires.....	17
1.5 Das Schwein als Tiermodell zur Untersuchung der Funktion von $\gamma\delta$ T-Zellen innerhalb des Immunsystems	19
1.6 $\gamma\delta$ T-Zellen des Schweins	20
1.6.1 Pränatale Entwicklung der $\gamma\delta$ T-Zellen beim Schwein.....	20
1.6.2 Das $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoire des Schweins	21

2. Aufgabenstellung	23
2.1 Untersuchung entwicklungsabhängiger Veränderungen des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoires während der Pränatalzeit.....	23
2.2 Untersuchungen zum Einfluß von Mikroorganismen auf das postnatale $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoire.....	24
3. Material und Methoden	25
3.1 Die Probengewinnung	25
3.1.1 Versuchstierkollektiv	27
3.2 Gewebeaufschluß und RNA-Extraktion	29
3.3 Reverse Transkription der RNA – die cDNA-Synthese	30
3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
3.4.1 Agarose-Elektrophorese der PCR-Produkte	34
3.5 CDR3 Längenanalyse mittels Polyacrylamidgel- Elektrophorese (PAGE)	35
3.5.1 Photographische Dokumentation der PAGE.....	38
3.6 Direkte Sequenzanalyse der $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Transkripte.....	39
3.6.1 Isolierung und Reamplifikation definierter DNA-Fragmente	40
3.6.2 Präparation von Sequenziermatrizen.....	40
3.6.3 DNA-Sequenzierung nach dem Kettenabbruchverfahren mit Hilfe farbstoffkodierter 2',3'-Didesoxynukleotide.....	41
3.6.4 Generierung von Nukleotid-Sequenzdaten	42
3.6.5 EDV-gestützte Verarbeitung von DNA-Sequenzdaten mit anschließender CDR3 Längenanalyse.....	42
3.7 Indirekte Sequenzanalyse der TCR δ Transkripte nach Subklonierung.....	43
3.7.1 Subklonierung von Rezeptortranskripten einer bestimmten CDR3 Länge	43
3.7.2 Das „T-Vektor“-Klonierungssystem	44

3.7.3	Generierung rekombinanter Plasmide durch Ligation	45
3.7.4	Transformation von <i>Escherichia coli</i> Rezipientenstämme	46
4.	Ergebnisse	47
4.1	Pränatale Entwicklung des TCR δ Repertoires des Schweins	49
4.2	Molekularbiologische Besonderheiten der fetalen $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Transkripte	69
4.3	Postnatale Entwicklung des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoires von keimfreien bzw. spezifisch-Pathogen-freien Schweinen.....	72
4.3.1	Das $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoire von 10 Wochen alten spezifisch-Pathogen-freien (SPF) Schweinen	72
4.3.2	Das $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoire von 10 Wochen alten keimfreien (GF) Schweinen.....	73
5.	Diskussion	77
5.1	Pränatale Entwicklung $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor Repertoires des Schweins	77
5.1.1	Charakteristika der invariablen DV3 Kette des fetalen Schweins	77
5.1.2	Die Rolle des Enzyms TdT bei der fetalen Entwicklung des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoires verschiedener Spezies	79
5.1.3	Die Bedeutung der invariablen DV3 Kette des Schweins	80
5.1.4	Mögliche Mechanismen bei der Entstehung der invariablen DV3 Kette	81
5.1.5	Die invariable DV3 Kette als mögliche primitive Form der immunologischen Erkennung.....	84
5.1.6	Vergleichende Analyse der invariablen Ketten vom Schwein, dem Menschen und der Maus.....	85
5.1.7	Die Rolle des Thymus bei der fetalen Entwicklung	86
5.2	Untersuchung zum Einfluß durch Mikroorganismen auf das postnatale $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoire anhand keimfreier bzw. spezifisch-Pathogen-freier Schweine.....	87

6. Zusammenfassung.....	90
6.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache	90
6.2 Zusammenfassung in englischer Sprache	93
7. Literaturverzeichnis	95
8. Anhang	116
8.1 Danksagung	116
8.2 Wissenschaftliche Publikationen	118
8.3 Zusammensetzung der verwendeten Puffer	119
8.4 Abkürzungsverzeichnis.....	121
8.5 Curriculum vitae.....	127
8.6 Ehrenwörtliche Erklärung	130

1. Einleitung

1.1 Das mukosale Immunsystem

Die mukosalen Oberflächen von gesunden Menschen werden als Kontaktfläche zur Außenwelt mit einer Vielzahl von Antigenen konfrontiert, die zum einen Pathogene, zum anderen aber auch harmlose Partikel darstellen können. Demnach wird dem mukosalen Immunsystems eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität, bei der Initiierung einer Immunabwehr sowie bei der Induktion von oraler Toleranz gegenüber Nahrungsantigenen zugeschrieben. Ein Beispiel für die Folgen, die bei Eintreten einer Inkompetenz des mukosalen Immunsystems entstehen können, stellt die Krankheit AIDS dar, bei der opportunistische Erkrankungen fatal sind. Zum anderen führen hyperaktivierte T-Zellen bei oraler Intoleranz z.B. zu Lebensmittel-bedingten Enteropathien (1).

Das Interesse an $\gamma\delta$ T-Zellen, die in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehen, ist darin begründet, daß sie einen beträchtlichen Teil zur Aufrechterhaltung des mukosalen Immunsystems beizutragen scheinen. Man hat nachgewiesen, daß $\gamma\delta$ T-Zellen im Vergleich zu $\alpha\beta$ T-Zellen in epithelialen Geweben wie dem Intestinum überrepräsentiert sind. So machen $\gamma\delta$ T-Zellen etwa 5-15% der intraepithelialen Lymphozyten (IEL, siehe unten) im Dünndarm und bis zu 20% der IEL im Kolon aus. Im Gegensatz dazu bilden $\alpha\beta$ T-Lymphozyten die Mehrheit (>95%) unter den CD3+Lymphozyten im peripheren Blut gesunder Individuen. Ein ähnliches Verhältnis herrscht auch in den meisten peripheren lymphatischen Geweben (2; 3).

Das mukosale Immunsystem des Darms liegt in kompartimentierter Form vor, um Angriffe auf die Integrität der Mukosa effektiv abwenden zu können. Es umfasst 1) das organisierte Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (engl. GALT), z.B. in Form von Peyer'schen Plaques, 2) die mukosale Lamina propria und 3) die Lamina epithelialis mit intraepithelialen Lymphozyten (IEL) (1).

1.1.1 Die Lamina epithelialis

Zwischen den Epithelzellen befinden sich sogenannte intraepitheliale Lymphozyten (IEL), wobei diese zu der Basalmembran, die das Epithel von der Lamina propria trennt, Kontakt haben. Ihre genaue Funktion ist noch unbekannt. Allerdings geht man davon aus, daß sie einen entscheidenden Beitrag bei der Bewerkstelligung der oben genannten Aufgaben des mukosalen Immunsystems leisten (siehe Abbildung 1).

Beim Menschen konnte gezeigt werden, daß auf 6-10 Epithelzellen ein IEL kommt (4). IEL bestehen fast ausschließlich aus T-Zellen und setzen sich zu 70 – 85 % aus $\alpha\beta$ und zu 15-30% aus $\gamma\delta$ T-Zellen zusammen (2; 5; 6). Während $\alpha\beta$ IEL überwiegend CD8+ sind, exprimieren $\alpha\beta$ T-Zellen der Lamina propria überwiegend CD4+ (7). Bei einem Großteil der $\alpha\beta$ IEL handelt es sich um Gedächtniszellen (CD45R0+) (8). $\gamma\delta$ IEL setzen sich aus CD4- CD8- und CD4- und CD8+ Subpopulationen zusammen (9).

Bei humanen Feten konnte gezeigt werden, daß die ersten IEL in der 11. Gestationswoche erscheinen (10) und ihre Zahl sowohl mit steigendem Gestationsalter (11) als auch postnatal unter normalen Bedingungen mit dem Alter stetig zunimmt (4; 12). Bei Untersuchungen an keimfreien Mäusen und Ratten konnte in Abhängigkeit von mikrobiellen Antigenen eine Differenz zwischen $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ IEL aufgezeigt werden: während eine Keimbesiedlung zu einer Zunahme der Anzahl an $\alpha\beta$ IEL führt (13; 14), so scheint das Vorkommen von $\gamma\delta$ IEL davon unabhängig zu sein (15).

Da man den IEL eine Rolle als „Wächter des Epithels“ zuschreibt, bedarf es einer Antwort auf die Frage, auf welche Art und Weise sie diese Aufgabe verrichten, wenn man bedenkt, in welcher verhältnismäßig geringen Anzahl sich diese Zellen präsentieren. Man hat die Hypothese aufgestellt, daß IEL durch die Interaktion zwischen Antigen und ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) aktiviert werden (16) und über eine Sekretion zahlreicher Botenstoffe mit den Immunzellen der Lamina propria kommunizieren (17).

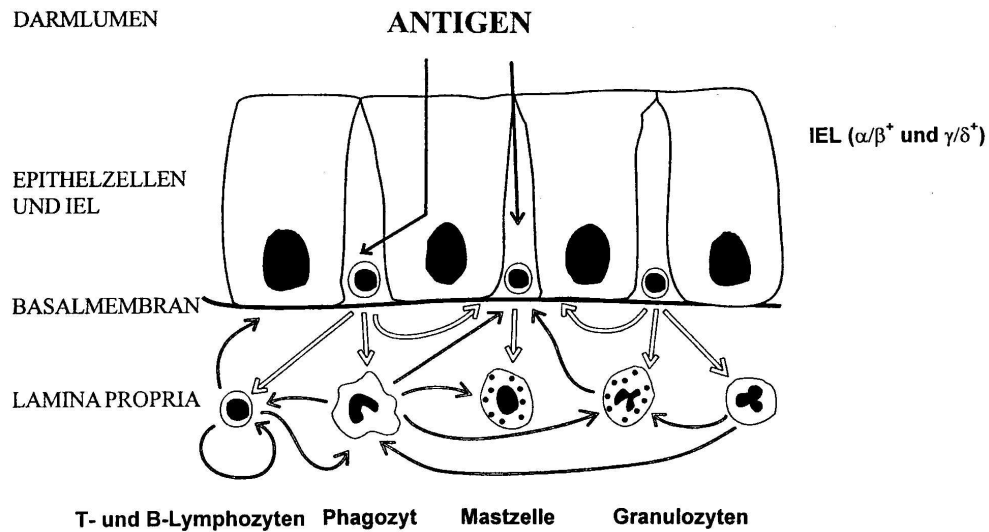


Abbildung 1: Modell zur mukosalen Immunantwort

(aus: W. Holtmeier: Intraepitheliale Lymphozyten: Die erste Garde der Immunabwehr? (18))

Um aber der großen Vielfalt an Antigenen gerecht zu werden, müssten IEL eine entsprechende Vielfalt an T-Zell-Rezeptoren besitzen. Einige Studien konnten das Gegenteil demonstrieren: sowohl das TCR Repertoire von $\gamma\delta$ IEL als auch $\alpha\beta$ IEL bei gesunden erwachsenen Menschen ist oligoklonal (19-25). So scheinen sich IEL auf die Erkennung einer limitierten Anzahl charakteristischer Strukturen zu beschränken, die sowohl von Fremd- als auch Eigenantigenen verkörpert werden können. Die Hypothese der Erkennung von Eigenantigenen wird gestützt durch die in Kapitel 1.2.1 dargelegten Beobachtungen, daß $\gamma\delta$ IEL durch einige Streß-induzierbare, den Hitzeschockproteinen verwandten Eigenantigene bzw. den MHC Molekülen verwandten Oberflächenrezeptoren aktiviert werden können. So könnte eine große Anzahl an IEL aktiviert werden, ohne daß es zuvor zu einer Zeit raubenden klonalen Expansion kommen müsste. Auf diese Weise würde eine schnelle und effiziente Immunabwehr gewährleistet werden.

1.1.2 Die Zusammensetzung der Lamina propria

Dieses Kompartiment wird beim Menschen bereits ab der 14. Gestationswoche mit T-Zellen besiedelt (26). Es befinden sich neben T-Zellen zusätzlich andere Immunzellen wie B-Zellen, Plasmazellen, Antigen-präsentierende dendritische Zellen, Makrophagen, Eosinophile, neutrophile Granulozyten. Unter den T-Zellen exprimiert die breite Mehrheit (~98%) den $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor. Diese sind überwiegend CD4+positiv (27; 28). $\gamma\delta$ T-Zellen finden sich im Gegensatz zu $\alpha\beta$ T-Zellen kaum in der Lamina propria (7) und sind zu je ca. 50% CD4-/CD8-negativ und zu 50% CD8+ positiv (9). Des weiteren stellen die meisten $\alpha\beta$ T-Zellen (~80%) sowie $\gamma\delta$ T-Zellen (~75%) Gedächtniszellen (CD45R0+) dar. Im peripheren Blut bilden nur etwa 40% diese Fraktion (29). Den Marker CD69, der höchstwahrscheinlich nach einer kürzlichen Aktivierung gebildet wird, exprimieren alle $\gamma\delta$ T-Zellen und etwa 90% der CD4+positiven sowie CD8+positiven Zellen in diesem Kompartiment (30), hingegen zeigen sie keine proliferative Aktivität (31).

Neben dieser diffusen T-Zell-Population in der Lamina propria, existieren auch sogenannte Lymphozyten-gefüllte Villi (engl. LFV) (32). Man hat sie mit „Cryptopatches“ verglichen, die man bei konventionellen, keimfreien als auch athymischen Mäusen entdeckt hat und denen man folglich eine entscheidende Rolle bei der extrathymischen Entwicklung von T-Zellen beimisst. Da man allerdings einen erheblichen Unterschied dieser beiden Formationen bei Mensch und Maus festgestellt hat, stellen LFV beim Menschen höchstwahrscheinlich keinen Ort für eine extrathymische Entwicklung dar (33).

1.1.3 Lymphozytenprägung, -rezirkulation und -homing im Darm

Die These über die mukosale Immunität lautet, daß naive intestinale T-Zellen im darmassoziierten lymphatischen Gewebe eine Antigen-induzierte Aktivierung erfahren, nachfolgend proliferieren und sich anschließend im Organismus verteilen.

Die Peyer'schen Plaques stellen einen bisher gut erforschten Bestandteil des darmassoziierten lymphatischen Gewebes dar. Man konnte beobachten, daß naive T-Zellen mittels spezieller Oberflächenmoleküle (siehe unten) vom peripheren Blut über spezielle Venen, den HEV (high endothelial venule), in die parafollikuläre T-Zell-Zone der Peyer'schen Plaques rekrutiert werden. Das Domepithel dieser Plaques wird teilweise von Membran-Zellen (M-Zellen) gebildet, die Antigene in das lymphatische Gewebe aufnehmen können. Vorort erfolgt nun eine Antigen-induzierte Aktivierung und Proliferation. Die nun durch bestimmte Antigene geprägten T-Gedächtniszellen emigrieren via efferenter Lymphe in die mesenterialen Lymphknoten. Ihr Weg führt weiter über den Ductus thoracicus in das periphere Blut (1).

Essentiell für eine effektive Immunantwort ist zum einen die kontinuierliche Lymphozytenzirkulation zwischen lymphatischen Geweben und zum anderen die spezifische Invasion von Lymphozyten in periphere Gewebe. Die zielgerichtete Einwanderung von Lymphozyten in vorherbestimmte Regionen wird „Homing“ genannt. Ermöglicht wird dies dadurch, daß bestimmte T-Zellen mittels ihrer Adhäsionsmoleküle, die u.a. als Integrine und Selektine bezeichnet werden, mit Liganden des vaskulären Epithels bestimmter Gewebe interagieren, die als Adressine bezeichnet werden. Beispielsweise wird die Einwanderung von bestimmten T-Zellen in die Mukosa des Darms dadurch ermöglicht, daß das Adhäsionsmolekül $\alpha 4\beta 7$ von T-Zellen mit MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1) von Endothelzellen der HEV von Peyer'schen Plaques und kleinen Venen der Lamina propria interagiert (34). Fast alle IEL exprimieren das Integrin $\alpha E\beta 7$, das Affinität zu dem epithelialen E-Cadherin aufweist (35). Zusätzlich scheinen Chemokine bei der Migration von Lymphozyten eine große Rolle zu spielen (36).

1.2 $\gamma\delta$ T-Zellen im Vergleich zu $\alpha\beta$ T-Zellen

Das zelluläre Immunsystem des Menschen umfasst funktionell als auch phänotypisch verschiedene Zellpopulationen: neben der B-Zell-Reihe besteht die T-Zell-Reihe, die sich wiederum in zwei verschiedene T-Zellpopulationen aufzweigt, die der $\alpha\beta$ und der $\gamma\delta$ T-Zellen. Diese Ordnung hat sich nicht nur über entwicklungsgeschichtlich bedeutende Zeiträume hinweg aufrechterhalten, sondern existiert auch in allen bisher untersuchten Tierspezies. $\gamma\delta$ T-Zellen unterscheiden sich von $\alpha\beta$ T-Zellen in Bezug auf die Spezifität, auf das Expressionsmuster der CD4- und CD8-Correzeptoren und auf die anatomische Verteilung. Die beiden T-Zelltypen sind auch funktionell verschieden, obwohl man über die Aufgabe der $\gamma\delta$ T-Zellen noch wenig weiß.

$\alpha\beta$ T-Zellen werden in CD4 positive (T-Helferzellen) und CD8 positive Zellen (zytotoxische und T-Suppressorzellen) eingeteilt. Bei der Antigenerkennung bedürfen sie einer Präsentation bestimmter Epitope durch MHC-Moleküle, der sogenannten MHC-Restriktion. Der Typ der MHC-Restriktion hängt von dem jeweilig exprimierten CD4 bzw. CD8 Molekül ab. CD4+ $\alpha\beta$ T-Zellen erkennen Peptide, die von exogenen Antigenen, wie Mikroorganismen, stammen und die von MHC Klasse II Molekülen präsentiert werden. CD8+ $\alpha\beta$ T-Zellen erkennen Peptide, die nach endogenem Prozessieren von z. B. viralem Material durch MHC Klasse I Moleküle präsentiert werden. Die Oberflächenmoleküle sind nicht nur an der Antigenbindung beteiligt, sondern auch an der Auslösung der Signaltransduktionskaskade. Diese bewirkt die Ausschüttung von Interleukinen, welche eine weiterreichende Immunreaktion anregen, sowie von zytotoxischen Stoffen, welche die Lyse von präsentierten Zellen bewirken. Zudem existieren doppelt negative (CD4-CD8-) $\alpha\beta$ T-Zellen (DN), die Glykopeptide, die z. B. von Mykobakterien stammen, mittels CD1-Restriktion erkennen (37; 38).

$\gamma\delta$ T-Zellen besitzen einige Eigenschaften, die sie von $\alpha\beta$ T-Zellen unterscheiden. Die Mehrheit der zirkulierenden $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren weder die Moleküle CD4, noch CD8. Eine kleine Gruppe von CD8 positiven $\gamma\delta$ T-Zellen konnte identifiziert werden (39). Diese exprimieren in der Regel das

Homodimer $CD8\alpha\alpha$ und nicht das Heterodimer $CD8\alpha\beta$, das von konventionellen $\alpha\beta$ T-Zellen exprimiert wird (40).

1.2.1 Die Antigenerkennung der $\gamma\delta$ T-Zellen

Das zuvor erwähnte reichliche Auftreten von $\gamma\delta$ T-Zellen in mukosalen Oberflächen veranlasst zur Annahme, daß sie eine Komponente einer „ersten Verteidigungslinie“ darstellen (41-43) und damit erste Schritte einer Immunantwort in Gang setzen. Dies bedeutet, daß $\gamma\delta$ T-Zellen Eigenschaften aufweisen müssten, die zur Bewerkstellung einer schnellen Immunantwort beitragen könnten.

Eine solche Eigenschaft stellt zum einen die selbständige Antigen-Erkennung dar, bei der $\gamma\delta$ T-Zellen nicht, ähnlich den Immunglobulinen, auf die zeitverzögernde Antigen-Präsentation von AP-Zellen (APC) angewiesen sind. Diese Vorstellung gründet auf röntgenkristallographischen Untersuchungen, bei denen man topographische Ähnlichkeiten zwischen den Antigen-bindenden Domänen des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptors und der Immunglobulinschwerketten der B-Zellen feststellen konnte (44-46). Auch der Mangel der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 läßt auf diese Art der Antigen-Erkennung schließen.

Die Beobachtung, daß $\gamma\delta$ T-Zellen in epithelialen Geweben über ein stark eingeschränktes TCR-Repertoire verfügen (20; 47), hat zur Annahme geführt, daß sie sich auf ein bestimmtes Antigen-Set beschränken und auch durch diese Eigenschaft zur Bewerkstellung einer schnellen Immunantwort beitragen. Jene Antigene könnten zum einen durch konservierte Fremdanigene, die auf verschiedenen Mikroorganismen anzutreffen sind, oder aber durch konservierte Eigenantigene dargestellt werden.

Als Fremdanigene könnten phosphathaltige Antigene und Alkylamine von besonderer Bedeutung sein. Es konnte demonstriert werden, daß diese nicht-peptidischen Antigene, die von zahlreichen Mikroorganismen (gramnegative und -positive Stäbchen, grampositive Kokken, Mykobakterien, Plasmodien, Toxoplasmen) und Pflanzen gebildet werden, von den im Blut dominierenden $V\gamma9V\delta2+$ T-Zellen ohne MHC-Restriktion erkannt werden (48-50).

In Hinblick auf Eigenantigene diskutiert man Streß-induzierbare Hitze-Schock-Proteine oder die der MHC Klasse I verwandten Moleküle MICA und MICB, die durch hitzeschockreagible Promotoren kontrolliert werden (51). Es wurde demonstriert, daß tumorassoziierte Hitze-Schock-Proteine $\gamma\delta$ T-Zellen aktivieren (52). Zudem konnte gezeigt werden, daß intestinale V δ 1 Subpopulationen durch die Oberflächenmoleküle MICA/B auf Enterozyten aktiviert werden, deren Expression durch Streß-Situationen wie Infektion oder Entzündung induziert wird (53). Der natürliche Ligand für MICA/B ist NKG2d, der von einer Subpopulation der $\gamma\delta$ T-Zellen, aber auch Natürlichen Killerzellen und CD8+ $\alpha\beta$ T-Zellen gebildet wird (54). Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung besagt, daß der $\gamma\delta$ TCR selbst direkt MICA/B bindet (55).

Durch das Erkennen von Streß-induzierten Eigenantigenen wird möglicherweise eine rasche Immunantwort ermöglicht.

1.2.2 $\gamma\delta$ T-Zellen erhalten epitheliale Integrität

$\gamma\delta$ T-Zellen tragen auch insofern zur unspezifischen Immunabwehr bei, als daß sie sich bei der Aufrechterhaltung der mechanischen Mukosabarriere beteiligen. Es wurde beschrieben, daß $\gamma\delta$ T-Zellen epitheliale Wachstumsfaktoren wie Keratinozytenwachstumsfaktor (KGF) (56-59), protektive Stoffe (wie „connective tissue growth factor“) (60) und anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 (61; 62) sezernieren, die die epitheliale Integrität aufrechterhalten. So konnte bei $\gamma\delta$ TCR Knock-out Mäusen gezeigt werden, daß weniger Epithelzellen proliferierten als beim Wildtyp, während dieses bei $\alpha\beta$ Knock-out Mäusen nicht zu beobachten war (63).

1.2.3 Die Rolle der $\gamma\delta$ T-Zellen im System der Immunabwehr

$\gamma\delta$ T-Zellen tragen zum einen, wie zuvor beschrieben, zur angeborenen unspezifischen Immunabwehr bei, zum anderen agieren sie auch als Mitglieder des erworbenen Immunsystems. Dies wurde anhand von Studien belegt, die

sich mit Infektionen, die durch Mykobakterien verursacht worden sind, befassten (64).

Zudem sind $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lage, eine Vermittlerposition zwischen dem angeborenem, unspezifischen und dem erworbenen, spezifischen Immunsystem einzunehmen. Es konnte nachgewiesen werden, daß $\gamma\delta$ T-Zellen zum einen die Reifung von naiven Dendritischen Zellen (DC) bewirken, die Bakterienantigene präsentieren. Ausschlaggebend ist hierbei die Interaktion des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptors mit dem Oberflächenmolekül CD1, das von der aktivierten Dendritischen Zelle expremiert wird. Zum anderen rufen sie durch diesen Vorgang und die nachfolgende Interleukin-Ausschüttung eine klonale Expansion von CD4+Th1 Zellen hervor (56; 65-67). Gleichzeitig sind derart aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lage, benachbarte infizierte oder transformierte Zellen zu töten (68).

Kommt es zu einer Infektion, so agieren $\gamma\delta$ T-Zellen, abhängig von der jeweiligen Stufe der Immunantwort, in verschiedenen Funktionsweisen. Man konnte anhand von Infektions-Modellen der Maus zeigen, daß $\gamma\delta$ T-Zellen aus Subpopulationen bestehen, die in Abhängigkeit ihres expremierten T-Zell-Rezeptors Funktionen wahrnehmen, die einerseits pro-inflammatorische, also zu Beginn der Infektion, und andererseits anti-inflammatorische Wirkung, d.h. am Ende der Infektion, besitzen (69; 70).

1.2.4 Die Rolle der $\gamma\delta$ T-Zellen in Bezug auf Krankheit

$\gamma\delta$ T-Zellen stellen aus medizinischer Sicht eine interessante Zellpopulation dar, da sie bei der Pathogenese von vielen Krankheiten eine wichtige Rolle zu spielen scheinen.

$\gamma\delta$ T-Zellen wurden in Bezug auf Autoimmunkrankheiten untersucht. Beispielsweise wurde bei Rheumatoider Arthritis eine erhöhte Anzahl V δ 1+T-Zellen in der entzündeten Synovia festgestellt (71). Bei Patienten, die an Multipler Sklerose erkrankt waren, konnten in aktiven Läsionsherden des ZNS und im Liquor cerebrospinalis $\gamma\delta$ T-Zellen nachgewiesen werden (72).

Auch bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) M.Crohn und Colitis ulcerosa mehren sich die Hinweise für eine autoimmune Genese. In Tiermodellen zu CED konnte gezeigt werden, daß die Entzündung im Darm durch T-Zellen induziert (73; 74), als auch transferiert werden kann (75-77). Zudem ist sie abhängig von einer normaler Mikroflora, was Hinweis darauf gibt, daß mikrobielle Antigene eventuell autoreaktive T-Zellen aktivieren könnten (74). Es bleibt die Frage zu klären, ob nun $\gamma\delta$ T-Zellen eine destruktive oder eine protektive Rolle spielen. Die Hypothese, dass $\gamma\delta$ T-Zellen eine protektive Funktion zukommen könnte, findet Bestätigung in einem Maus-Modell für Colitis, in dem verminderte Epithelregeneration und erhöhte Mortalität bei $\gamma\delta$ defizienten Mäusen demonstriert werden konnte (59; 78; 79).

Auch bei Infektionen, die durch Bakterien oder Parasiten verursacht wurden, konnte eine vermehrte Anzahl $\gamma\delta$ T-Zellen demonstriert werden. Es sei aufgrund der Vielzahl von Beispielen nur jeweils ein Vertreter zu nennen: Bakterielle Infektionen durch *Mycobacterium tuberculosis* (80; 81) oder parasitäre Infektion wie Malaria durch *Plasmodium falciparum* (82). Ein Beispiel dafür, daß $\gamma\delta$ T-Zellen auch bei viralen Infektionen involviert sind, liefert der Nachweis von einem veränderten $\gamma\delta$ TCR-Repertoire im peripheren Blut von HIV-Infizierten (83).

Auch bei dem Fall von maligner Entartung sind $\gamma\delta$ T-Zellen involviert. Es konnte demonstriert werden, daß menschliche Natürliche Killerzellen und V δ 1+ T-Zellen, die NKG2d Rezeptoren tragen, Tumorzellen lysieren können, die MICA exprimieren (54; 84). Als klinisches Beispiel sei das Kolon-Carcinom genannt, bei dem V δ 1+ T-Zellen isoliert werden konnten, die eine Vielzahl epithelialer Tumorzellen lysierten (85). Zudem zeigten Versuche an Mäusen, daß die Tiere, die nicht über $\gamma\delta$ T-Zellen verfügten, sehr empfänglich für carcinogene Vorgänge in der Haut waren (86). Einige Krebsarten scheinen die Immunantwort zu beeinträchtigen, indem sie große Mengen an löslichem MICA produzieren, das NKG2d bindet, wodurch in der Folge eine Downregulation von NKG2d hervorgerufen wird (87).

1.3 Der $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor

1.3.1 Die Struktur des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptors

$\gamma\delta$ T-Zellen tragen gemäß den $\alpha\beta$ T-Zellen auf ihrer Oberfläche einen heterodimeren Rezeptor, der aus einer γ - und einer δ -Kette besteht. Sie stellen membranständige Glykoproteine dar, die sich in eine extrazelluläre, transmembranäre und intrazelluläre Domäne einteilen lassen. Die funktionelle Einheit des Rezeptors besteht neben dem $\gamma\delta$ Heterodimer aus niedermolekularen, invarianten Membranproteinen, dem CD3 Komplex. Dieser wird auch von $\alpha\beta$ -T-Zellen verwendet und ist verantwortlich für die Stabilisierung des Rezeptors und die Signaltransduktionskaskade. Er setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen (CD3- γ , - δ , - ϵ , - ζ).

Nur ein bestimmter Teil des Rezeptors hat direkten Kontakt mit den antigenen Determinanten immunogener Strukturen und bestimmt folglich die Spezifität des Rezeptors: die CDR3-Domäne („third complementarity determining region“) oder „Junctional Region“ (88). Sie umfasst die Verbindungsstellen der Variablen- (V), Diversity- (D) und Joining (J) Regionen und kann eine hohe Diversität aufweisen (16; 89) (siehe Abbildung 2). CDR1 und CDR2 Regionen bilden die Peripherie des Rezeptors.

Es konnte gezeigt werden, daß die durchschnittliche Längenverteilung der CDR3 Region der $\gamma\delta$ Ketten eher der von Immunglobulinen ähnelt als der von $\alpha\beta$ Ketten (89). Auch topographische Ähnlichkeiten zwischen den CDR3 Regionen der $\gamma\delta$ T-Zellen und den Antigen-bindenden Domänen der Immunglobulinschwerketten der B-Zellen konnten mittels röntgenkristallographischen Untersuchungen bestätigt werden (44-46). Daraus schließt man unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich der Antigenbindung zwischen $\gamma\delta$ T-Zellen und $\alpha\beta$ T-Zellen (89). Der $\gamma\delta$ TCR stellt eine konservierte, aber einzigartige Struktur dar, die wahrscheinlich seit mehr als 450 Millionen Jahren für die Antigenerkennung zur Verwendung kommt. Sein Evolutionsalter kommt dem von Genen gleich, die der Aktivierung von Rekombination dienen (90).

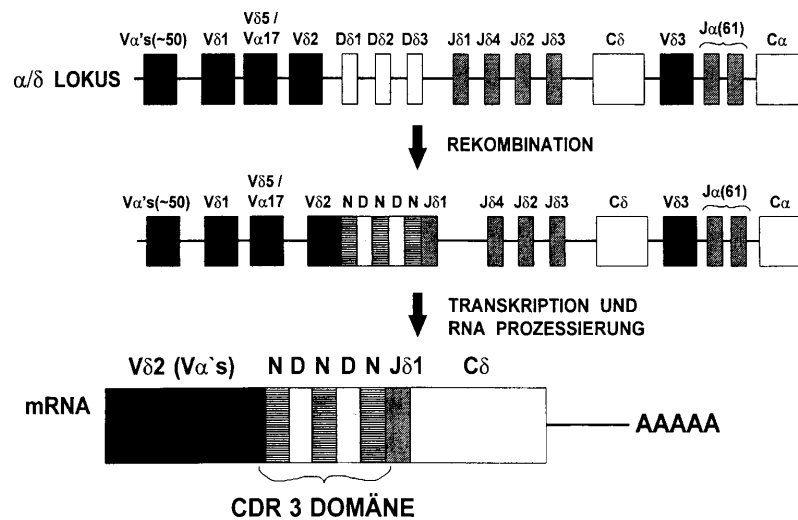


Abbildung 2: Rearrangement des humanen δ T-Zell-Rezeptors

Der TCR δ -Lokus liegt inmitten des TCR α -Lokus auf Chromosom 14 (91). Während des Rekombinationsvorgangs kommt es zu einer Verbindung einer der drei V-Regionen mit bis zu drei D-Regionen, und einer J-Region (16), wobei auch V α Regionen benutzt werden können (20; 92; 93). (V δ 3 liegt in inverser Orientierung einige Basenpaare stromabwärts von C δ (94; 95)). Zudem kommt es zwischen den entsprechenden Gen-Segmenten zu Nukleotid-Insertionen (N). Die CDR3 Domäne umfasst den Rezeptorabschnitt, der die D- und N-Regionen beinhaltet und somit die größte Diversität aufweist. Sie bestimmt die Spezifität des Rezeptors und tritt vermutlich in direkten Kontakt mit dem Antigen (88).

(aus: W. Holtmeier: Intraepitheliale Lymphozyten: Die erste Garde der Immunabwehr? (18))

1.3.2 Genetische Organisation

Die vier Genfamilien der TCR-Ketten α , β , γ , δ scheinen über einen entsprechend langen Zeitraum konserviert worden zu sein (90). Der TCR δ -Lokus liegt inmitten des $V\alpha$ -Lokus auf Chromosom 14 (91), während der TCR γ -Lokus auf Chromosom 7 zu finden ist.

Analysen ergaben, daß auch $V\alpha$ Regionen mit dem δ -Lokus rekombinieren und somit Teil einer funktionellen δ -Kette bilden können (92; 93). Kommt es allerdings zur Bildung einer funktionellen α -Kette durch $\alpha\beta$ T-Zellen, so wird der δ Genkomplex bei dem Rearrangement deletiert. Auf den γ Genkomplex, der sich nicht in der Nähe der α - oder β -Genen befindet, wird zum Teil auch durch $\alpha\beta$ T-Zellen zugegriffen, wobei sie die γ -Ketten nur transkribieren und nicht exprimieren. Transkripte von γ -Ketten liegen demnach in $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen vor. Aus diesem Grunde richteten wir unsere Untersuchungen auf RNA-Ebene auf den Nachweis der δ -Kette aus, da γ Ketten oftmals nicht von $\gamma\delta$ T-Zellen stammen.

1.3.3 Entstehung funktioneller $\gamma\delta$ -Ketten mittels Rekombination

Die Potenz des Immunsystems ist auf das Vermögen zurückzuführen, Billionen von verschiedenen Antigen-Rezeptoren zu schaffen, indem verschiedene Gensegmente mittels somatischer Rekombination zusammengesetzt werden (96). Bei der Rekombination wird je ein V (variabel)-Gen-Segment mit je einem J (Joining)-Gen-Segment und dem C (konsant)-Gen-Segment verbunden.

Am γ - und δ -Lokus gibt es wesentlich weniger V-Gen-Segmente als am α - oder β -Lokus oder an jedem Immunglobulin-Lokus. Eine erhöhte Verknüpfungvariabilität der δ -Ketten gleicht die geringere Zahl von möglichen variablen Regionen aus; sie führt dazu, daß sich die gesamte Variabilität der $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptoren auf die Verbindungsregion (CDR3 Region) konzentriert.

Der δ Genkomplex des Menschen verfügt über drei $V\delta$ -Gen-Segmente, vier $J\delta$ -Gen-Segmente und, im Gegensatz zum γ - und α -Lokus, über drei zusätzliche

D δ -Gen-Segmente, die durch ein Dazwischenschalten die Vielfalt der Verbindungsregion erhöhen (97; 98).

Die Diversität wird noch durch weitere Mechanismen erhöht. Zum einen ermöglicht die besondere Lokalisation des δ Genkomplexes inmitten des α -Genkomplexes, daß Verknüpfungen zwischen einer V α -Region und D δ sowie J δ und C δ stattfinden (92; 97).

Zum anderen kommt es im Bereich rekombinanter D-Segmente zur Addition bzw. Deletion matrizenunabhängiger Nukleotide (N-Region) sowie zum Anheften palindromischer Mono- oder Dinukleotide (P-Nukleotide). Bei der Spaltung kodierender Gen-Segmente entstehen freie Enden, die nicht direkt ligiert werden, sondern zunächst „geschlossen“ werden, so daß Haarnadelstrukturen entstehen. Anschließend spaltet die Endonuklease die DNA-Haarnadelstruktur an einer zufälligen Position, so daß sich eine einzelsträngiges DNA-Ende bildet. Dieser DNA-Bereich, der nun Nukleotide enthalten kann, die in der doppelsträngigen DNA ursprünglich komplementär zueinander waren, wird Palindrom genannt. Anschließend fügt eine terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) bis zu 20 beliebige N-Nukleotide an die freien DNA-Enden an. Nachfolgend lagern sich die beiden DNA-Stränge an. Reparaturenzyme schneiden nichtgepaarte Basenpaare ab, lagern komplementäre Nukleotide an und ligieren schließlich die DNA mit den P-Nukleotiden. Auf diese Weise wird es dem Zufall überlassen, wieviele Nukleotide angefügt werden. Demnach kommt es in über der Hälfte der Fälle zu Rasterverschiebungen der kodierenden Sequenz mit folglich funktionslosem Protein. Derartige „nicht-produktive“ Umordnungen werden also bei der Generierung größter junktionaler Diversität Inkauf genommen.

Trotz der kleinen Zahl an V-Gen-Segmenten und der limitierten kombinatorischen Diversität der TCR- γ - und TCR- δ -Gen-Familien, ist, aufgrund der oben genannten Eigenschaften und Mechanismen (z.B. die zusätzlichen drei D-Segmente), die Zahl der theoretisch möglichen $\gamma\delta$ TCRs, die sich auf etwa 10^{20} beläuft, größer als die der $\alpha\beta$ TCRs (ca. 10^{15}) und B-Zell-Ig-Rezeptoren (ca. 10^{11}) zusammengenommen (16).

1.4 Entwicklung der $\gamma\delta$ T-Zellen beim Menschen

1.4.1 Pränatale Entwicklung der $\gamma\delta$ T-Zellen und des fetalen T-Zell-Rezeptor-Repertoires

Im Gegensatz zu $\alpha\beta$ T-Zellen, deren Entwicklung und Reifung fast ausschließlich vom Thymus abhängt, können $\gamma\delta$ T-Zellen auch in extrathymischen Geweben generiert werden. Studien ergaben, daß sowohl die fetale Leber als auch der primitive Darm noch vor der Kolonisation des Thymus (< 8 Gestationswoche) zur Entwicklung verschiedener $\gamma\delta$ T-Zellpopulationen beitragen (99-102).

Untersuchungen an menschlichen Feten unterschiedlichen Alters haben ergeben, daß die Generierung des humanen $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoires in verschiedenen Organen während der Pränatalperiode nach einem strikt entwicklungsabhängigen Programm abzulaufen scheint, dessen Schrittmacher noch nicht definiert worden sind.

Wie in dem Kapitel 1.3 dargelegt, kann die CDR3 Region des Rezeptors über eine enorme Diversität verfügen. Aus theoretischer Sicht erscheint demnach die Formation des Rezeptors zufällig. Bei der genauen Analyse des pränatalen $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoires von unterschiedlichen Organen fällt auf, daß der Rezeptor in der frühen Fetalzeit über eine limitierte Diversität verfügt. Diese ist erstens auf einen nicht zufälligen, sondern bevorzugten Gebrauch bestimmter Gen-Segmente zurückzuführen, zweitens auf die seltene bis fehlende Insertion von N- oder P-Nukleotiden (Mangel an dem Enzym Terminale Deoxynucleotidyltransferase, TdT). Diese wenig diversen Rezeptor-Transkripte zeigen Organ- und Individuen-übergreifendes Vorkommen (99; 103). Bei Mäusen wurden ähnliche Sequenzen (ohne D/N Region) entdeckt (104), die das fetale Repertoire dominierten (105-107). Eine derartige Dominanz konnte beim humanen fetalen Repertoire nicht verzeichnet werden.

Mit Fortschreiten der Fetalzeit (Beginn des dritten Trimesters der Gestation) kommt es zu einer Zunahme der Rezeptor-Diversität: der Zugriff auf verschiedene Gen-Segmente wird erweitert und N-Nukleotid-Insertionen werden aufgrund des nun aktiven Enzyms TdT zahlreicher (108; 109). Es

resultieren vielfältigere CDR3 Regionen, deren Längen mit fortschreitendem Gestationsalter zunehmen. Je stärker das Repertoire über Diversität verfügt, desto mehr schwindet das Organ- und Individuen- übergreifende Vorkommen von Rezeptor-Transkripten. Die Vielfalt des humanen $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoires wird bis in das frühe postnatale Leben gesteigert (103), wobei es dann mit zunehmendem Alter eine Einschränkung erfährt (siehe 1.4.3).

Die dargestellten Beobachtungen veranlassten zur Annahme, daß die Generierung des humanen $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoires während der Pränatalperiode nach einem genetisch kontrolliertem Programm abläuft. Die Frage nach entsprechenden Schrittmachern ist noch ungeklärt. Diskutiert werden Mechanismen auf DNA-Ebene: ein vorprogrammiertes Gen-Rearrangement, eine Homologie-gesteuerte Gen-Rekombination und eine entwicklungsabhängige Aktivierung des Enzyms TdT. Auch andere Mechanismen wie eine Antigen-vermittelte Selektion und Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen kommen in Frage. Demnach könnten Antigene, die zu bestimmten Zeiten in hämatopoetischen Gewebe expremiert werden, auf die Entwicklung der $\gamma\delta$ T-Zellen und deren Rezeptor-Repertoire Einfluß nehmen (103).

1.4.2 Funktion der $\gamma\delta$ T-Zellen während dem fetalen Leben

Man stellt sich die Frage, welche Aufgaben $\gamma\delta$ T-Zellen im Feten wahrnehmen. Die bereits während der Fetalzeit dominanten $V\gamma 9/V\delta 2^+$ T-Zellen haben die Fähigkeit, auf eine Vielfalt mikrobieller Pathogene wie z. B. Mykobakterien (99; 101) zu antworten und mütterliche Zellen (110) sowie Tumorzellen (111; 112) zu töten. Demnach wird ihnen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort des Feten als auch des Erwachsenen zugeschrieben (20; 99-102; 111; 113).

Möglich ist auch eine anti-virale Aktivität dieser Zellen in utero, denn eine mütterliche HIV-Infektion verursacht nur in wenigen Fällen eine Infektion des Kindes, obwohl das Virus die Placenta-Schranke überwinden kann (114-116).

1.4.3 Postnatale Entwicklungsveränderungen des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoires

Das $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoire erfährt postnatal mit fortschreitendem Alter zunehmende Veränderungen.

Für das intestinale TCR δ Repertoire konnte demonstriert werden, daß es sich in der frühen Periode nach der Geburt polyklonal darstellt und über stärkere Diversität verfügt als das eines Feten, da es extensivere N-Nukleotid-Insertionen und häufigere komplexe Formationen wie bei Erwachsenen aufwies. Folglich unterscheidet sich das humane intestinale TCR δ Repertoire erheblich von dem einer Maus, bei dem die extensive junktionale Diversität bei Geburt fehlt und N Nukleotid Additionen nicht vor dem 3. bis 5. postnatalen Tag erscheinen, an dem das Enzym TdT exprimiert wird (117).

Mit zunehmendem Alter kommt es zu einer Einschränkung des intestinalen TCR δ Repertoires, so daß es sich ab etwa dem 14.-17. Lebensjahr oligoklonal darstellt. In diesem Alter schon zeigt es wenige Differenzen zu dem eines Erwachsenen der 6. bis 7. Lebensdekade.

Ein weiteres Merkmal des adulten TCR δ Repertoires besteht darin, daß es, einem Fingerabdruck ähnlich, einzigartig für das jeweilige Individuum ist. Es existieren keine die für den Feten typischen, Individuen-überlappende Sequenzen, die in ihrer Diversität eingeschränkt sind.

Zum anderen konnte gezeigt werden, daß das TCR δ Repertoire innerhalb des Organs Kolon oder Dünndarm identisch ist. Eine entsprechende Stabilität des Repertoires innerhalb des Organs über eine Zeitperiode von 1-2 Jahren wurde nachgewiesen (20; 22; 113).

Im peripheren Blut stellt sich das bei Geburt polyklonale TCR δ Repertoire bereits in einem Alter von 3 Jahren oligoklonal dar (20; 22; 118; 119), während das periphere CD8⁺ $\alpha\beta$ TCR Repertoire (120; 121) erst in einem Alter von 10 bis 14 Jahren Oligoklonalität aufweist (122). Die Restriktion des TCR δ Repertoires findet zu einem Zeitpunkt statt, an dem sich die Thymusinvolution noch nicht vollzogen hat.

Bei der Frage, was das postnatale und adulte Repertoire zur Einschränkung veranlasst, gibt es viele Versuche, eine Antwort zu geben.

Die beobachtete Einschränkung des Repertoires und damit die Dominanz bestimmter $\gamma\delta$ T-Zell-Populationen in verschiedenen anatomischen Orten und an verschiedenen Zeiten während der Entwicklung führt zur Annahme, daß $\gamma\delta$ T-Zellen mit speziellen Funktionen selektiert werden, die den Anforderungen der unterschiedlichen Gewebe entsprechen oder der Protektion gegenüber mikrobieller Invasion dienen (103). Man diskutiert folgende Antigene, die die Selektion bewerkstelligen könnten: zum einen Fremdanigene wie phosphathaltige Antigene oder nichtphosphorylierte Alkylamine als Bestandteil von Mikroben, zum anderen Streß-induzierte Eigenantigene, von denen man weiß, daß sie auf intestinalen Epithelzellen expremiert werden (90).

Einige Studien messen der exogenen Antigenstimulation durch Bakterien oder andere Umweltantigene große Bedeutung bei (123; 124), da man bei Studien mit eineiigen Zwillingen und Familien gesehen hat, daß genetische Einflüsse keine große Rolle spielen (125-127). Wiederum unwahrscheinlich ist, daß die Bakterienkolonisation des Darms allein für die Beeinflussung des Repertoires verantwortlich ist, da sich die Restriktion des intestinalen TCR δ Repertoires erst in der 2. Lebensdekade vollzieht, also weit später als der Beginn der bakteriellen Darmkolonisation (113). Der Grund für diese Vermutung ist die bei $\alpha\beta$ T-Zellen gemachte Beobachtung, daß das adulte intestinale $\alpha\beta$ TCR Repertoire sowohl von konventionellen als auch keimfreien Mäusen oligoklonal und unabhängig von der Darmflora ist (128). Diese Studienergebnisse geben Hinweise darauf, daß die Erkennung von entwicklungsabhängig expressierten Eigenantigenen eine bedeutende Rolle spielen könnte.

Die beobachtete Gleichheit des oligoklonalen TCR δ Repertoires an entfernten Orten des adulten Kolons und Dünndarms ist gut mit einem Modell vereinbar, in dem $\gamma\delta$ T Zellen, selektiert durch Liganden des Intestinaltrakts, in der intestinalen Mukosa und in extra-intestinalen Geweben expandieren, rezirkulieren und zuletzt an Orten entlang des Kolon und des Dünndarms ansiedeln. Es ist eher unwahrscheinlich, daß die Entwicklung des an verschiedenen Orten entlang des Dünndarms und des Kolon nahezu identischen TCR δ Repertoires während der ersten Lebensjahre darauf beruht, daß

beliebige $\gamma\delta$ T Zellen aus extraintestinalen Geweben zufällig heranwachsen und es darauffolgend zu einer uniformen Expansion und Absiedlung an mehreren Stellen entlang des Darms kommt. Zudem würde auch ein Prozess eines in situ TCR δ Gen-Rearrangements in der intraepithelialen Region nicht die Entwicklung eines derartigen TCR δ Repertoires entlang des Dünndarms oder Kolons erklären (113).

1.5 Das Schwein als Tiermodell zur Untersuchung der Funktion von $\gamma\delta$ T-Zellen innerhalb des Immunsystems

Mit dem Ziel, tiefere Einblicke in die Biologie der $\gamma\delta$ T-Zellen und deren Interaktionen innerhalb des Immunsystems zu erlangen, bedienen wir uns des Tiermodells Schwein.

Das Schwein stellt aus folgenden Gründen ein wichtiges Studienmodell dar.

- 1) Aufgrund seiner Größe ist, im Gegensatz zu Nagetieren, eine wiederholte Probenentnahme aus dem Darm anhand der Endoskopie möglich. Des weiteren kann Lymphe mittels Kannülierung intestinaler Lymphgefäße gewonnen werden (129), was besonders dann interessant ist, wenn die mukosale Immunantwort z. B. nach Immunisierung untersucht werden soll.
- 2) Die meisten Forschungsergebnisse in der Immunologie basieren auf Untersuchungen an Mäusen und Ratten. Da diese aber häufig nicht auf den Menschen übertragbar sind und das Schwein dem Menschen evolutionär näher steht, ist es von besonderem Interesse, Daten über das Schwein zu erheben.
- 3) Das Schwein ist auch insofern für Forschungszwecke attraktiv, als daß es über eine hohe Zahl an $\gamma\delta$ T-Zellen verfügt (130-132).
- 4) Da das Schwein einen potentiellen Donor für Xeno-Transplantation darstellt, dürfte folglich die Forschung an seinem Immunsystem auf breite Unterstützung von Seiten der Human- und Veterinärmediziner treffen.

Die im folgenden genannten Gründe rechtfertigen die Verwendung des Schweins als Tiermodell zur Erforschung der Mechanismen, die die Biologie der $\gamma\delta$ T-Zellen kontrollieren. Zum einen wurde gezeigt, daß die Hauptpopulationen der lymphatischen Zellen des Schweins mit denen des Menschen übereinstimmen (133). Zum anderen enthüllten vorangehende Versuche unserer Arbeitsgruppe verblüffende Ähnlichkeiten zwischen den TCR δ Repertoiren von Mensch und Schwein. Gegenstand der Untersuchungen war die postnatale Entwicklung und Kompartimentierung des TCR δ Repertoires von mukosalen und extraintestinalen Geweben beim Schwein (134). Es konnte demonstriert werden, daß, ähnlich den bereits erhobenen Daten beim Menschen (113), das TCR δ Repertoire von jungen Schweinen stark polyklonal ist, während es mit zunehmendem Alter eine Oligoklonalität sowie Kompartimentierung aufweist.

1.6 $\gamma\delta$ T-Zellen des Schweins

Im Gegensatz zum Menschen machen die peripheren $\gamma\delta$ T-Zellen des Schweins fast die Hälfte der Gesamtzahl der T-Zellen im peripheren Blut aus (130-132).

1.6.1 Pränatale Entwicklung der $\gamma\delta$ T-Zellen beim Schwein

Untersuchungen an fetalen Schweinen unterschiedlichen Alters haben gezeigt, daß $\gamma\delta$ T-Zellen die ersten detektierbaren T-Zellen darstellen. Sie erscheinen im Thymus um den 40. Tag der Tragzeit (TZ40) herum, zudem gehört die Mehrheit der CD3 ϵ hi Thymozyten dem $\gamma\delta$ Stammbaum an (135-137). Periphere T-Zellen erscheinen fünf Tage später, wobei es sich bei den meisten um $\gamma\delta$ T-Zellen handelt.

Das frühe Vorherrschen der $\gamma\delta$ T-Zellen, welches zunächst den Thymus und dann die Peripherie betrifft, ist in gleicher Weise bei Mäusen (138), Hühnern (139) und Menschen (99; 100; 103) zu finden, allerdings nicht bei Schafen (140) und Ratten (141).

Bis zum 50./55. Tag der Tragzeit repräsentieren die $\gamma\delta$ T-Zellen fast ausschließlich alle CD3 ϵ hi Thymozyten (135; 137). Mit dem Fortschreiten der Fetalzeit kommt es zu einer Veränderung des Verhältnisses zwischen $\gamma\delta$ T-Zellen und $\alpha\beta$ T-Zellen: die Anzahl der $\gamma\delta$ T-Zellen verringert sich, während sich die der $\alpha\beta$ T-Zellen erhöht. Es resultiert eine Dominanz der $\alpha\beta$ T-Zellen sowohl im Thymus als auch in der Peripherie (130; 135; 137). Gegen Ende der Tragzeit (TZ90-114) hingegen kommt es zu einer schnellen Expansion der $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut und in der Milz. Der nun wieder abnehmende T-Zell-Quotient $\alpha\beta/\gamma\delta$ gilt auch für die Postnatalperiode. Demzufolge trifft man in Blut und Milz von postnatalen Schweinen auf eine hohe Anzahl $\gamma\delta$ T-Zellen. Bei jungen Schweinen machen $\gamma\delta$ T-Zellen etwa 20% der peripheren Lymphozyten aus (130), bei älteren Schweinen beträgt dieser Anteil bis zu 40-60% (142). Im Gegensatz dazu befinden sich bei Menschen und Nagetieren nur wenige $\gamma\delta$ T-Zellen im zirkulierenden T-Zell-Pool (130).

1.6.2 Das $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoire des Schweins

Es wurden bisher relativ wenige Daten über das $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor(TCR)-Repertoire des Schweins erhoben. Der Grund dafür liegt in dem zuvor erwähnten Mangel an Antikörpern, die V δ oder V γ Ketten erkennen könnten. Demnach ist es nicht möglich, mittels Antikörper alle $\gamma\delta$ T-Zellen nachzuweisen (131; 143). Folglich ist die Analyse des $\gamma\delta$ TCR Repertoires zur Zeit auf molekulare Methoden beschränkt.

Die konstante Region der δ Kette wurde bereits vor einigen Jahren geklont (144). Die variablen Regionen TCRD, DD und DJ wurden in einer Veröffentlichung definiert, nachdem man cDNA und genomische DNA des Thymus eines 1 Monate alten keimfreien Schweins sequenziert hatte (145). Bisher waren keine anderen Organe oder Schweine anderer Altersgruppen Gegenstand von Studien. Demnach werden TCRD Regionen in fünf Familien eingeteilt, wobei das Kriterium der Zugehörigkeit die 75%ige Nukleotid-Übereinstimmung darstellt. Die TCRD1 Familie umfasst 15 Mitglieder, DV3 und

DV5 jeweils zwei und DV2 sowie DV4 je ein Mitglied. Zudem wurden vier verschiedene DJ Gensegmente und drei vermeintliche DD Segmente beschrieben (145). Kürzlich wurde beim Schwein die komplette genomische Region, die das T-Zell-Rezeptor δ C(konstant)-Segment (TCRDC) und die J(Joining)-Segmente (TCRDJ) beinhaltet, sequenziert (146).

Es läßt sich folgern, daß das TCR δ Repertoire über ein enormes Potential von Diversität auf dem Boden von Rekombination verfügt, und zwar in stärkerem Maße als es bereits für Menschen und Mäuse beschrieben wurde. Anzumerken ist, daß beim Vergleich der genomischen Sequenzen von Mensch, Schwein und Maus die meisten DJ-Segmente des Schweins stärker denen des Menschen als der Maus ähneln (146).

2. Aufgabenstellung

2.1 Untersuchung entwicklungsabhängiger Veränderungen des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoires während der Pränatalzeit

Vorherige Untersuchungen hatten dargelegt, daß die postnatalen entwicklungsabhängigen Veränderungen des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor(TCR)-Repertoires als auch dessen Kompartimentierung innerhalb des Organismus bei Mensch und Schwein sehr ähnlich sind (103; 113). Es konnte somit die Verwendung des Schweins als Tiermodell gerechtfertigt werden. Es soll weiteren Untersuchungen dienen, um das Verständnis über die Biologie der $\gamma\delta$ T-Zellen zu vertiefen. Es wurde bereits die Hypothese aufgestellt, daß $\gamma\delta$ T-Zellen eine erste Garde der Immunabwehr darstellen und mittels klonaler Expansion eine rasche Immunantwort bewerkstelligen könnten. Es bleiben Fragen zu klären, auf welche Art und Weise ihre Entwicklung beeinflusst wird, welche Antigene sie erkennen und wie sie innerhalb des Immunsystems agieren.

Bisher wurden keine Daten in Hinblick auf die *pränatale* Entwicklung des $\gamma\delta$ TCR Repertoires des Schweins erhoben, was bei Mäusen (107; 147; 148), Schafen (149; 150) und Menschen (101-103; 113) bereits geschehen ist.

So wurde in einem Versuchsteil dieser Arbeit der Vergleich zwischen Mensch und Schwein auf die Pränatalperiode ausgeweitet, indem die hier erhobenen Daten über den Schweinefeten den bereits erhobenen Daten über den menschlichen Feten gegenübergestellt wurden. Es galt folgende Fragestellung:

- 1) Erfährt das fetale $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor(TCR)-Repertoire des Schweins während der Pränatalperiode Veränderungen? Wenn ja, welche?
- 2) Ist die pränatale Entwicklung des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor(TCR)-Repertoires des Schweins mit der des Menschen vergleichbar?

2.2 Untersuchungen zum Einfluß von Mikroorganismen auf das postnatale $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoire

In einem zweiten Versuchsteil dieser Arbeit waren wir bestrebt, die Frage nach den Faktoren zu klären, die die Einschränkungen des stark polyklonalen $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor(TCR)-Repertoire von jungen Schweinen mit zunehmendem Alter respektive die Kompartimentierung bewirken. Mögliche Faktoren könnten Antigene darstellen, die Fremdanitigenen wie Phosphoantigene oder nicht-phosphorylierte Alkylamine entsprechen und die man in Mikroben findet, aber auch Streß-induzierte Selbst-Antigene, die auf intestinalen Epithelzellen expressiert werden (53; 90; 151). In Hinblick auf $\alpha\beta$ T-Zellen ist bekannt, daß Antigene der normalen Flora einen wichtigen Stimulus darstellen, da ihre Zahl in keimfreien Schweinen während der ersten 6 Lebenswochen nicht ansteigt (152; 153).

In unseren Versuchen sollte zunächst der Einfluss des Selektionsdruckes, der durch Mikroorganismen, das heißt Fremdanitigenen, hervorgerufen wird, eliminiert werden. Auf diese Weise erhofften wir uns Hinweise darauf, ob Fremd- oder Eigenantigene durch $\gamma\delta$ T-Zellen erkannt werden.

Zur Verwendung kamen hierbei Proben von 10 Wochen alten Schweinen, die einerseits unter spezifisch-Pathogen-freien und andererseits unter keimfreien Bedingungen aufgezogen waren. Das mukosale Immunsystem der spezifisch-Pathogen-freien Schweine ist vergleichbar mit jenem von konventionell gehaltenen Schweinen, außer daß deren Darmflora frei von pathogenen Keimen ist. Es galt folgende Fragestellung:

- 1) Unterscheidet sich das $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor(TCR)-Repertoire spezifisch-Pathogen-freier Schweine von dem konventioneller Schweine? Wenn ja, wie?
- 2) Unterscheidet sich das $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor(TCR)-Repertoire keimfreier Schweine von dem konventioneller Schweine? Wenn ja, wie?

3. Material und Methoden

3.1 Die Probengewinnung

Die Proben der vorliegenden Arbeit stammen zum Teil von Schweinefeten, zum Teil von Schweinen der frühen postnatalen Periode, die unter keimfreien (GF) bzw. spezifisch-Pathogen-freien (SPF) Bedingungen aufgezogen wurden.

Die Tragzeit beim Schwein beträgt 114 Tage, für deren Ermittlung wurde das Datum des Paarungstages herangezogen.

In dieser Studie wurden fetale Proben von mehreren Milzen des 70., 90. und 110. Tages der Tragzeit (TZ70, -90, -110) von jungen Schweinen der Rasse „White crossbred (WC)“ (ein Viertel Yorkshire, ein Viertel Chester White, ein Viertel Large White, ein Viertel Landrace) aus dem Roman L. Hruska U.S. Meat Animals Research Center sowie von F1 Kreuzungen aus Yorkshire und Meishan der Iowa State University verwendet.

Mehrere fetale Gewebeproben von verschiedenen Organen von TZ38, -57, -59, -95, -99 und 114 stammen von der Minnesota Miniatur Schwein Rasse aus Novy Hradek durch wiederholtes Kreuzen mit outbred black Vietnam-Asian und weißen Malaysia-abstammenden Schweinen, die nach hoher Fruchtbarkeit und geringer Größe selektiert wurden.

Das Schwein des 114. Tages der Tragzeit (TZ114) wurde sofort nach der Geburt geschlachtet. Die Feten der anderen verschiedenen Tragzeiten wurden mittels Hysterektomie aus dem graviden Uterus unter systemischer Halothan-Sauerstoff-Anästhesie geborgen.

Die GF- und SPF-Schweine wurden in einem Alter von 10 Wochen geschlachtet, nachdem sie unter bereits beschriebenen Standardbedingungen gehalten wurden (154).

Das Serum aller Schweine wurden auf gewöhnliche Schwein-Pathogene negativ getestet. Alle Schweine waren bei der Schlachtung gesund und in normalem Allgemeinzustand.

Die Gewebeproben wurden den Schweinen bzw. den Schweinefeten nach der Schlachtung aus diversen Organen entnommen, die in den folgenden Tabellen

aufgeführt sind. Direkt im Anschluss wurden die Proben in spezielle Kryoröhrchen (*NUNC GmbH*, Wiesbaden) überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die aus Vollblut isolierten mononukleären Zellen (PBMC) wurden nach ihrer Anreicherung über einen *Ficoll-Paque*[®]-Gradienten in jeweils 1 ml *TRizol*[®] Reagenz resuspendiert und analog zu den anderen Gewebeproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Per Expressmail wurden die Proben in unser Labor geschickt, wo sie bis zum weiteren mechanischen Aufschluß bzw. zur Nukleinsäureextraktion bei -80°C (*Colora E80*, *HERAEUS INSTRUMENTS*, Hanau) gelagert wurden.

Alle Experimente wurden von dem Institut für Mikrobiologie der Tschechischen Universität der Wissenschaft in der Tschechischen Republik in Einklang mit den Richtlinien des Tierschutzgesetzes genehmigt.

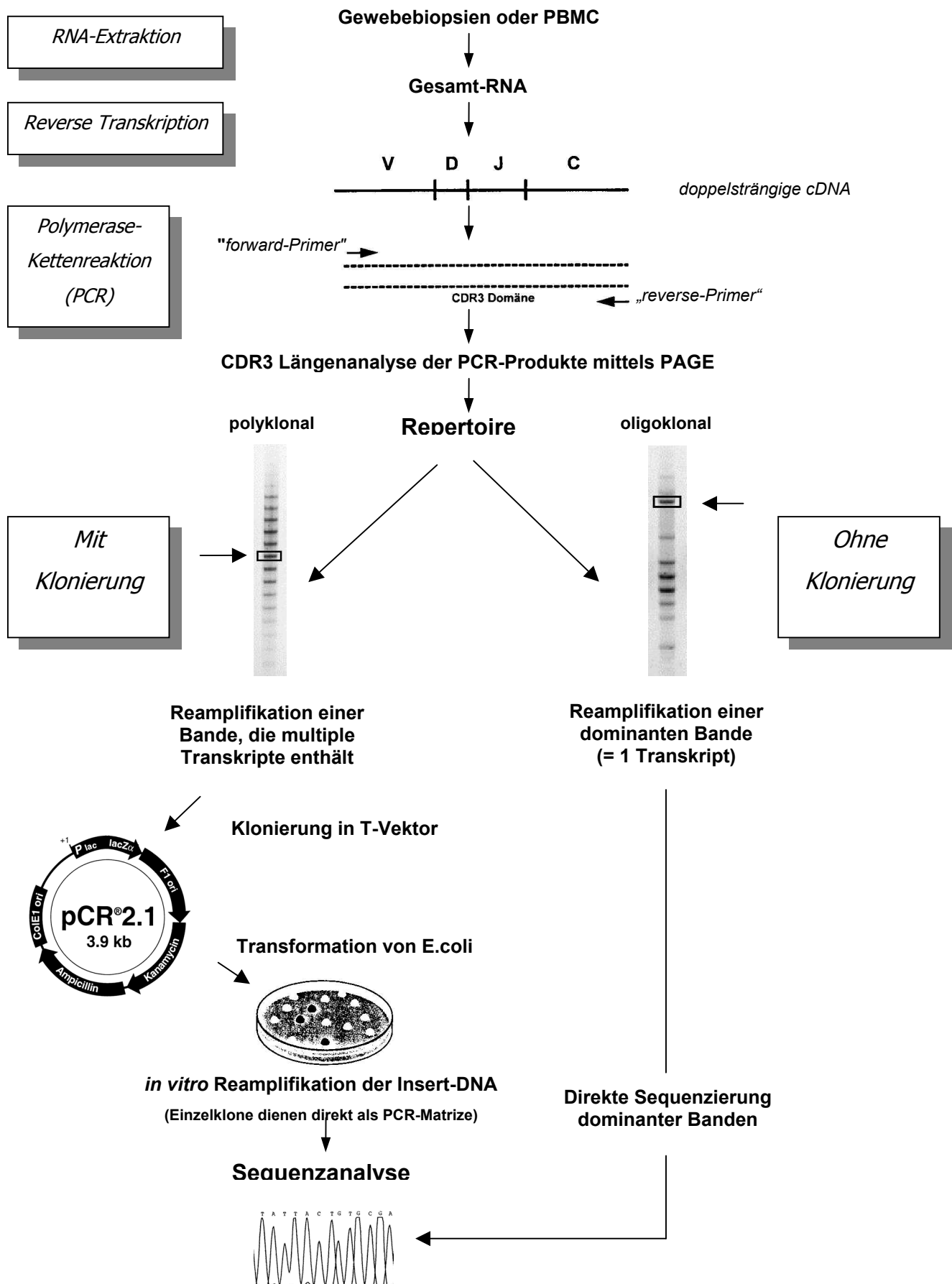
3.1.1 Versuchstierkollektiv

Tier	Alter [Tragzeit]	Rasse	Proben
TZ 70 I	70. Tag	White crossbred / Yorkshire x Meishan F1 Kreuzung	Milz
TZ 70 II			
TZ 70 III			
TZ 90 I	90. Tag		
TZ 90 II			
TZ 90 III			
TZ 110 I	110. Tag		
TZ 110 II			
TZ 110 III			

Tier	Alter [Tragzeit]	Rasse	Proben							
			Jejunum	Ileum	Kolon	Milz	Leber	Thymus	Knochenmark	PBMC
TZ 38	38. Tag	Minnesota Miniatur Schwein		X		X	X	X		
TZ 57	57. Tag					X	X	X	X	
TZ 59	59. Tag		X	X	X		X	X		X
TZ 95	95. Tag			X	X	X		X	X	X
TZ 99	99. Tag			X	X	X		X	X	X
TZ 114	114. Tag			X	X	X		X	X	X

Tier	Alter	Rasse	Aufzucht-Kondition	Gewicht [kg]	Organe					
					Jejunum	Ileale Payer'sche Plaques	Caecum	Mesenteriale Lymphknoten	Milz	Thymus
SPF 1	10 Wochen	Dänische Landrasse x "large white "	spezifisch- Pathogen-frei	9	x	X	X	X	X	X
SPF 2				10,5	x	X	X	X	X	X
GF 1			Keimfrei	7	x	X	X	X	X	X
GF 2				6,5	x	X	X	X	X	X

Abbildung 3: Fließschema des Versuchsaufbaus zur Analyse des δ TCR-Repertoires



3.2 Gewebeaufschluß und RNA-Extraktion

Die tiefgefrorenen Gewebeproben wurden mechanisch unter kontinuierlicher Kühlung mit Hilfe von elektrischen Glas/PTFE Homogenisatoren (*BRAUN*, Melsungen, FRG) in 1-2 ml einer sauren Phenollösung (*TRIzol*[®] Reagenz, *LIFE TECHNOLOGIES*,[™] Karlsruhe) aufgeschlossen.

Mit dem Ziel, das $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor(TCR)-Repertoire molekularbiologisch zu charakterisieren, mußte als Nächstes die in den aufgeschossenen Proben vorhandene RNA extrahiert werden. Die in je 1 ml *TRIzol*[®] resuspendierten Zellhomogenisate (sowohl Biopsien als auch PBMC) wurden zur Auflösung der Nukleoproteinkomplexe 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur vollständigen Homogenisierung wurde anschließend 200 μ l Chloroform (*SIGMA*, Deisenhofen) zugesetzt und beide Phasen kräftig geschüttelt (15 sec). Nach 15minütiger Zentrifugation bei 10.700 x g (+4°C, *HETTICH Micro 22R*) konnte die wässrige Oberphase, die die Gesamt-RNA enthält, abpipettiert werden. Die Präzipitation der Gesamt-RNA erfolgte nach Zugabe von 500 μ l 2-Propanol (*SIGMA*). Das RNA-Präzipitat wurde durch 10minütige Zentrifugation bei 10.700 x g (+4°C) sedimentiert und nach Entfernung anorganischer Salze mittels 1,3 ml 70%igem Ethanol (*MERCK*, Darmstadt) getrocknet. Abhängig von der Ausbeute der entsprechenden RNA-Extraktion bzw. der Menge des aufgeschlossenen Gewebes, erfolgte die Aufnahme der RNA-Präzipitate in 25 - 50 μ l RNase-freiem DEPC-H₂O (*CARL ROTH GmbH*, Karlsruhe). Im Anschluß 10minütige Inkubation bei 55 - 60°C (*Thermomixer 5436 EPPENDORF*, Hamburg). Zur Aufbewahrung wurden die RNA-Präparationen bei -80°C tiefgefroren (*Colora E80*).

Qualitätskontrolle der RNA-Extraktion

Um die Qualität der RNA-Extraktionen beurteilen zu können, bedienten wir uns der Elektrophorese mittels 1%iger Agarosegele, die zu 4 - 12% (v/v) eine 37%igen Methanallösung (*MERCK*) und zusätzlich 25 ppm EtBr (*APPLICHEM*, Darmstadt, FRG) enthielten. Jeweils 1 μ l des Aliquots der RNA-Präparationen wurden in 10 μ l RNase-freiem DEPC-H₂O (*CARL ROTH*) aufgenommen und 3 μ l

Probenpuffer zugesetzt. Schließlich erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei einer Spannung von 100 V (*PHARMACIA BIOTECH*) in 0,5 x TBE-Puffer. Um autokatalytische Hydrolysierung zu vermeiden, belief sich die Auftrennungszeit der RNA auf maximal 30 min.

Um das Resultat der Elektrophorese photographisch (*POLAROID FOTODYNE®/POLAROID 667*) dokumentieren zu können, wurden die in der Nukleinsäure interkalierten EtBr-Moleküle mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 312 \text{ nm}$ (*Fluo.Link TFL-20M*, *BIOMETRA*, Göttingen, FRG) angeregt. Die Qualität der RNA-Präparation war anhand der elektrophoretischen Auftrennung insofern beurteilbar, als intakte Total-RNA typischerweise Fraktionierungen in einem Größenbereich von $\sim 5 \text{ kb}$ sowie 2 kb , entsprechend der 28S bzw. 18S rRNA aufwies.

3.3 Reverse Transkription der RNA – die cDNA-Synthese

In diesem Arbeitsschritt wurde die zuvor extrahierte mRNA *in vitro* in die korrespondierende cDNA umgeschrieben, die im nächsten Versuchsschritt, der Polymerase-Kettenreaktion, als Matrize dienen sollte. Hierzu verwendeten wir rekombinante MMLV-reverse Transkriptase (*SuperScript™ II*, *LIFE TECHNOLOGIES™*) sowie kurze pd (T)₁₂₋₁₈-Oligonukleotide (*AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH*). Es wurden 1 - 2 μg Gesamt-RNA in einem Reaktionsvolumen von 20 μl eingesetzt. In einem ersten Schritt erfolgte die thermische Denaturierung der RNA. Danach setzte man jedem Ansatz für die Reverse Transkription 8 μl eines speziellen „Master-Mixes“ hinzu. Dieser enthielt alle erforderlichen Reaktionskomponenten inklusive des Enzyms. Im letzten Schritt erfolgte die cDNA-Synthese während eines 60minütigen Inkubationsintervalls bei 40°C unter Einsatz eines Thermal„cyklers“ (*Cetus 480™*, *PE APPLIED BIOSYSTEMS*, Weiterstadt, FRG). Alle Reaktionsparameter bezüglich Nukleotidkonzentration sowie eingesetzter Aktivität orientierten sich an den Empfehlungen des Enzymherstellers:

Reaktionsansatz für RT**physikalische Versuchsparameter**

Gesamt-RNA	1 - 5	µg	65°C	10' ⇒ Denaturierung der RNA
<i>SuperScript™ II</i>	200	U	0°C	10' ⇒ Zugabe von <i>MMLV</i> -RT
5'-pd (T) ₁₂₋₁₈ -3'	100	ng	40°C	60' ⇒ cDNA-Synthesephase
dNTP	50	µM (pro Nukleotid)	75°C	15' ⇒ Enzyminaktivierung
DTT	10	mM	4°C	∞
KCl	75	mM		
MgCl ₂	3	mM		
Tris-/HCl p _H = 8,3 (20°C)	50	mM		

Das Ergebnis der reversen Transkription der mRNA wurde in der anschließenden Test-PCR (sh. 3.4) beurteilt, bei der eine Negativ- und Positiv-Kontrolle (cDNA-Matrizenpräparation bekannter Eigenschaften) mitgeführt wurde.

3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die zuvor synthetisierte cDNA diente als Matrize bei der *in vitro* Vervielfältigung von DNA, der sogenannten Polymerase-Kettenreaktion. Es kommen sogenannte Primer zum Einsatz, die innerhalb konservierter Sequenzbereiche der variablen und konstanten Rezeptordomänen hybridisieren und somit den Rahmen für die in Zyklen ablaufenden Vervielfältigung der dazwischenliegenden DNA abstecken. Wir führten in aller Regel Standard-Polymerase-Kettenreaktionen mit 35 bis 39 Zyklen von 40 s bei 94 °C, 50 s bei 61°C und 1 min bei 72°C mit einer terminalen DNA-Synthesephase über 10 min bei 72 °C durch.

Um ein Anlagern der oben genannten Primer an konservierte Sequenzbereiche gewährleisten zu können, muß zum einen jene Sequenz bekannt sein und zum anderen der Primer in komplementärer Form entworfen werden. Die Sequenzen der δ Kettentranskripte des $\gamma\delta$ TCR wurden von Thome et al. (144) und Yang et al. (145) publiziert. Demnach können die TCRDV Regionen in fünf Familien eingeteilt werden, wobei das Einteilungskriterium durch eine 75%ige Übereinstimmung der Nukleotidsequenz definiert war: die DV1 Familie umfaßt

15 Familienmitglieder, wohingegen DV3 und DV5 jeweils aus zwei Gensegmenten und DV2 und DV4 aus jeweils einem Gen bestehen (145). Anzumerken ist, daß der Primer für TCRDV1 so konstruiert wurde, daß eine Anlagerung in der konservierten Region gewährleistet wird, die in fast allen bekannten Familienmitgliedern der V δ 1 Familie vertreten ist.

Es sei angemerkt, dass zur Vereinfachung statt z. B. TCRDV3 die kürzere Bezeichnung DV3 oder V δ 3 verwendet werden kann. Die ersten drei Buchstaben „TCR“ stehen für T-Zell-Rezeptor.

Es wurde zusätzlich ein Kontrollexperiment mit anderen Primern als die eben erwähnten durchgeführt, um die Möglichkeit einer PCR Kontamination auszuschließen, die die später beschriebene Dominanz eines Transkripts in verschiedenen Organen und Feten hätte erklären können. In diesem Versuch wurden Proben von Feten von TZ57 und TZ59 mittels den oben genannten als auch mittels anderer Primer amplifiziert, die außerhalb der zuvor amplifizierten DV3 Transkripte angreifen. Auf diese Weise konnten wir eine Amplifikation von zuvor amplifizierten PCR Produkten, die eventuell RNA oder PCR Reagentien hätten kontaminieren können, ausschließen. Tatsächlich schloß das Ergebnis eine solche Kontamination aus, indem sich ein fast identisches CDR3 Profil mit einer dominanten Bande für jeweils beide Arten von Primern ergab. Sequenzanalysen bestätigen, daß es sich bei der dominanten Bande um dieselbe Sequenz handelte.

Demnach kamen folgende Primer (*EUROGENTEC GERMANY*, Darmstadt) zur Anwendung:

δ TCR PCR – Primer

DV1-PIG	5` CTC ACC ATT TCA GCC TTA CAG	3`
DV2-PIG	5` ATC TCA GCC TCC CAG CTT GAG G	3`
DV3-PIG	5` ACA ATC TCT TCC TTA CAA CTG GC	3`
DV4-PIG	5` GAG TTT GAC ACT GAG TGA CTC GG	3`
DV5-PIG	5` TTC ACT TGG TGA TCT CCT CAG TG	3`
Cδ1-PIG	5` AAC GGA TGG TTT GGA ATT AGG C	3`

Cδ Primer für das DV3-Kontrollexperiment

Cδ - NEW	5`ACA AGA CAA GCA ACA TTT GTT CC	3`
----------	----------------------------------	----

Primer für β-Aktin-Kontrollexperiment

PIG-β-actin-sense:	5` ATT GTC ATG GAC TCT GGG GA	3`
PIG-β-actin-antisense:	5` CTC CGT GAG GAT CTT CAT GA	3`

δ TCR Sequenzierungs – Primer

PIG-δ-Seq1	5` GGA ATT AGG CTG ACT TCG	3`
------------	----------------------------	----

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit einem Reaktionsvolumen von 100 µl unter Verwendung eines Thermalcyklers (*GeneAmp® PCR Systeme 2400, 9600* bzw. *9700*, (alle *PE APPLIED BIOSYSTEMS*, Weiterstadt) durchgeführt.

Bei der verwendeten *AmpliTaq Gold™* DNA Polymerase (*PE APPLIED BIOSYSTEMS*) handelte es sich um eine chemisch modifizierte Form des thermostabilen Enzyms aus *Thermus aquaticus*, die bei Raumtemperatur keine enzymatische Aktivität aufwies. Aktiviert wurde das Enzym erst während der initialen 10minütigen Matrizendenaturierung, d.h. bei Temperaturen > 90°C. Diese Eigenschaft machte deren Zusatz zum Reaktionsansatz möglich. Somit waren darin neben der Matrizen-DNA alle die für Polymerase-Kettenreaktionen benötigten Komponenten enthalten. Auf diese Weise konnte die Kreuzkontaminationsgefahr drastisch reduziert werden. Wir wählten folgenden

Standard-Reaktionsansatz sowie folgende physikalische Parameter, die in der Regel den Herstellerangaben entsprachen:

Reaktionsansatz für PCR

Matrizen-DNA	100	ng
Taq DNA-Polymerase	2,5	U
„forward“-Primer	25	pmol
„reverse“-Primer	25	pmol
dNTP	150	μM (pro Nukleotid)
KCl	50	mM
MgCl ₂	1,5	mM
Tris-/HCl p _H = 8,3 (20°C)	10	mM

physikalische Versuchsparameter

95° C	10'	⇒ initiale Denaturierung
95° C	40''	⇒ Denaturierung der DNA
61° C	50''	⇒ Primer-Hybridisierung
72° C	60''	⇒ DNA-Synthesephase
72° C	10'	⇒ terminale DNA-Synthese
4° C	∞	

3.4.1 Agarose-Elektrophorese der PCR-Produkte

Um die Ergebnisse der Aufarbeitung beurteilen zu können, wurden die 0,15 – 0,25 kb großen PCR-Produkte mittels 2%iger Agarosegele elektrophoretisch aufgetrennt. Die Verwendung von Flachbett-Elektrophoresekammern (*Horizon 11 14, LIFE TECHNOLOGIES™*) machten Gelvolumina von 100 μl möglich. Zur Herstellung des Gels wurden 2 g Agarose (*BIOZYM*, Hess. Oldendorf, FRG) in 100 ml 1 x TBE-Puffer mittels Mikrowelle (*BOSCH*, Stuttgart, FRG) gelöst. Nach kurzer Abkühlung erfolgte die Zugabe von 2,5 ppm EtBr (*APPLICHEM*) sowie das Einfüllen des noch flüssigen Gels in die mit einem Taschenkamm versehene Elektrophoresekammer. Die Testansätze, die 15 μl PCR-Probe und 5 μl Probenpuffer enthielten, wurden in die entsprechenden Taschen des erkalteten Gels pipettiert und bei einer Feldstärke von 5 - 8 V x cm⁻¹ (*Consort E443/E835, FRÖBEL LABORTECHNIK*, Wasserburg, FRG) aufgetrennt. Die angelegte Spannung betrug 120 V, die Dauer belief sich auf etwa 90 min.

Die bildgebende Dokumentation erfolgte analog der zuvor beschriebenen photographischen Darstellung der aufgetrennten RNA (vgl. 3.2). Als Maßstab galt hier eine mitgeführte synthetische 100 bp DNA-„Leiter“ (*LIFE TECHNOLOGIES™*), von der man 1 μg in die erste Tasche des Gels pipettierte. Sie enthielt 15 Klassen von „blunt-end“ DNA-Fragmenten im Längenbereich zwischen 0,1 und 1,5 kb.

3.5 CDR3 Längenanalyse mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Mit dem Ziel, eine exakte CDR3 Längenanalyse der TCR δ Transkripte zu erreichen, bedienten wir uns bei der Durchführung der elektrophoretischen Auftrennung des 6%igen, denaturierenden Polyacrylamid-Gels. Das Auflösungsvermögen der PAGE ermöglicht in der Art die Differenz zwischen DNA-Fragmenten, deren Längen sich nur durch ein Nukleotid voneinander unterscheiden, daß sie mit dem bloßen Auge als zwei distinkte Banden erkannt werden können. Ein weiterer Vorteil der CDR3 Längenanalyse bestand darin, daß einzelne Banden aus dem Gel ausgeschnitten werden konnten, um die Sequenz der darin enthaltenen TCR δ Transkripte nach einer Reamplifikation analysieren zu können. Bei unseren PCR-Produkten ergab die Sequenzanalyse, daß bei der PAGE die meisten Banden in ihrer Länge um exakt drei Nukleotide differierten. Dies ist darauf zurückzuführen, daß funktionelle δ Transkripte nur über einen Leserahmen verfügen und drei Nukleotide eine Aminosäure kodieren.

Bei Verwendung des vertikalen *BaseAce*[™]-Sequenziergerätes (*STRATAGENE*) mussten die Polyacrylamidgele von Hand hergestellt werden. Ein Liter gebrauchsfertiger 6%iger Polyacrylamidlösung enthielt neben 150 ml 40%iger (19 : 1) Acrylamid-/Bisacrylamidlösung (*Roti-phorese Gel 40*,[®] *ROTH*) 7 mol Kohlendäurediamid (*APPLICHEM*) in 350 ml HPLC-H₂O (*MALLINCKRODT BAKER*, Griesheim) sowie 100 ml 10 x TBE-Stammlösung. Zur Herstellung einer denaturierenden Trennmatrix wurden 80 ml der 6%igen Polyacrylamidlösung mit 800 μ l 10%iger APS-Lösung (*APPLICHEM*) sowie 14 μ l TEMED (*FLUKA*) versetzt. Anschließend wurde das noch flüssige Gel in eine aus zwei Glasplatten unterschiedlicher Länge bestehenden „Sandwich“-Konstruktion (*STRATAGENE*) gefüllt. Nachdem das Gel erstarrt war, erfolgte dessen Beladen mit den Proben. Hierbei wurden 2,5 - 4 μ l der Testansätze, die aus je 7 μ l PCR-Probe sowie 5 μ l Puffer bestanden und nachdem sie drei Minuten bei 97°C

denaturiert wurden, in die vorhandenen Rechteckkammern pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung mittels PAGE erforderte Spannungen zwischen 1,6 und 1,8 kV (*Power Pac 3000*, *BIO-RAD* München). Bei einer Laufstrecke von 30 cm belief sich die Auftrennungsdauer auf etwa 120 bis 180 Minuten.

Im Anschluß wurde zur Visualisierung der aufgetrennten PCR-Produkte eine Silberfärbung gemäß Vorschrift des *Silver Sequence™ DNA Sequencing Systems* (*PROMEGA DEUTSCHLAND*, Mannheim) durchgeführt. Im Gegensatz zu radioaktiven Verfahren, bei denen es zum Einsatz von ^{32}P - bzw. ^{35}S -markierten Oligonukleotiden kommt, gestatteten Silberfärbungen direkte Isolierungen von Einzelbanden unter Sichtkontrolle.

Das Verfahren der Elektrophorese mittels 6%iger, denaturierender Polyacrylamidgele ermöglichte insofern eine Identifizierung dominanter TCR δ Transkripte, als daß die Intensität einzelner Banden mit deren Expressionsstärken korrelierte.

Hatte demnach die elektrophoretische Auftrennung eine Bandenverteilung gemäß einer Gauß'schen Glockenkurve zum Ergebnis (Abb. 4 a), bei der Banden mittlerer Länge in der Mitte des Gels quantitativ dominierten, so sprach man von einem *polyklonalen* TCR δ Repertoire. Es zeichnete sich dadurch aus, daß eine einzige Bande ein Gemisch von TCR δ Transkripten beinhaltete, die die gleiche CDR3 Länge aufwiesen, aber unterschiedliche Nukleotidsequenzen. Um also im Falle eines polyklonalen Repertoires die Nukleotidabfolge der entsprechenden TCR δ Transkripte analysieren zu können, musste man, nachdem die entsprechenden Banden ausgeschnitten und deren Transkripte reamplifiziert wurden (sh. 3.6.1), zunächst eine Subklonierung (sh. 3.7) durchführen, bevor man eine Sequenzanalyse (sh. 3.6) vornahm. Würde man den Schritt der Subklonierung nicht vorschalten (*indirekte* Sequenzierung), so ergäbe eine *direkte* Sequenzanalyse unlesbare Sequenzen. Diese Abfolge der Versuchsschritte wird in dem Fließschema (Abb. 3) dargestellt.

Hingegen stellte sich das Muster eines *oligoklonalen* TCR δ Repertoires, das auf Expansionen bestimmter Rezeptoren beruhte, in Form einzelner Banden dar, die unabhängig von ihrer Länge dominierten (Abb. 4 b). Da in diesem Fall dominante Banden nicht aus einem Gemisch verschiedener (polyklonales

Repertoire), sondern aus klonalen δ Transkripten mit identischen CDR3 Domänen bestanden, war eine *direkte* Sequenzanalyse (siehe 3.6) möglich, nachdem die entsprechenden Banden aus dem Gel isoliert und deren TCR δ Transkripte reamplifiziert wurden (siehe 3.6.1).

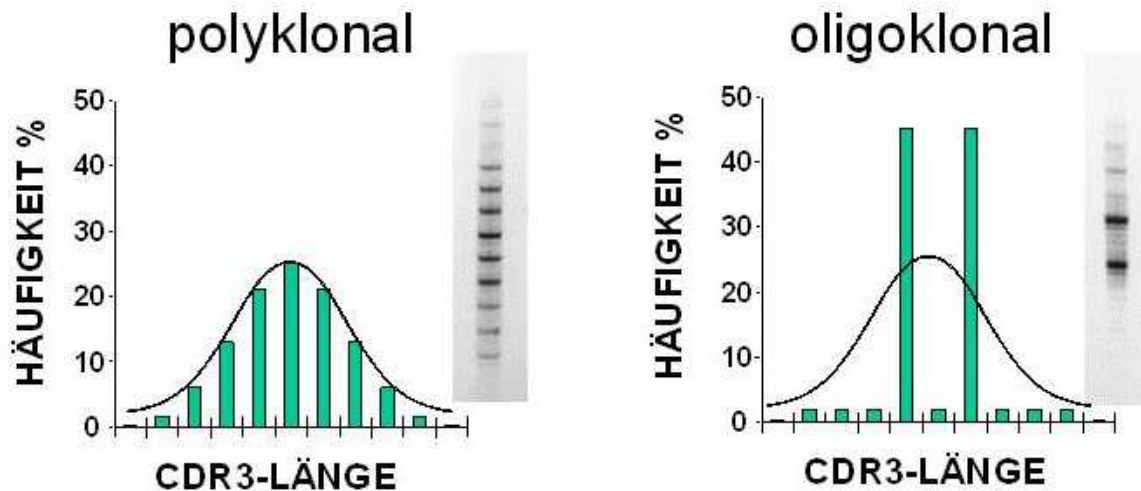


Abb. 4 a

Abb. 4 b

Abbildung 4: Polyklonale (a) und oligoklonale (b) CDR3–Profile in der denaturierenden PAGE

In einigen Fällen waren im CDR3 Längenprofil Doppelbanden zu beobachten. Es gab zwei mögliche Gründe für diese Artefakte: zum einen könnte die Ursache auf Höhe des Versuchsschritt PCR gelegen haben, bei der die Taq Polymerase einzelne Adenin-Additionen durchgeführt hatte. Zum anderen könnten den Artefakten unterschiedliche Migrationsartefakte der DNA-Stränge aufgrund von Konformationsunterschiede zugrunde gelegen haben. Sicher war, daß es sich hierbei um Artefakte handelte, da die Sequenzanalyse dieser Doppelbanden nur eine Nukleotidsequenz ergab.

3.5.1 Photographische Dokumentation der PAGE

Mit der Absicht, die PAGE mit ihren silbergefärbten DNA-Banden photographisch zu dokumentieren, verwendeten wir einen speziellen APC-Positivfilm (*Typopaque TR-Do 18*, *TYPON GRA-PHIC SYSTEMS AG*, Burgdorf, CH). Die Belichtungseinheit (*prolite5000*, *KAISER FOTOTECHNIK*, Buchen) musste auf den jeweiligen Hintergrund sowie die jeweilige Bandenintensität abgestimmt werden. Die Entwicklung der Bilder erfolgte mittels eines vollautomatischen Prozessorsystems (*Cronex T5A*, *DUPONT DE NEMOURS*, Neu-Isenburg, FRG).

Die photographischen Abbildungen wurden digitalisiert (*Snap Scan600/Foto Look*,[®] *AGFA-GEVAERT*, Mortsel, NL) und die entsprechenden TIFF-Dateien unter Zuhilfenahme der PC-Programme *MICROSOFT*[®] *Photoeditor*[®] 3.0 sowie *MS PowerPoint*[®] 97 bearbeitet.

3.6 Direkte Sequenzanalyse der $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Transkripte

Die Sequenzanalyse konnte im Fall eines oligoklonalen TCR δ Repertoires oftmals *direkt* durchgeführt werden, da eine Bande einer bestimmten CDR3 Länge auf dem Polyacrylamidgel TCR δ Transkripte beinhaltet, die sich durch eine identische Nukleotidsequenz auszeichneten (sh. 3.5). In einigen Fällen enthielt die Bande aber auch wenige TCR δ Transkripte einer anderen Sequenz, was dazu führt, daß diese bei der Sequenzanalyse in einem sogenannten „Grundrauschen“ untergehen. (siehe Abb. 5).

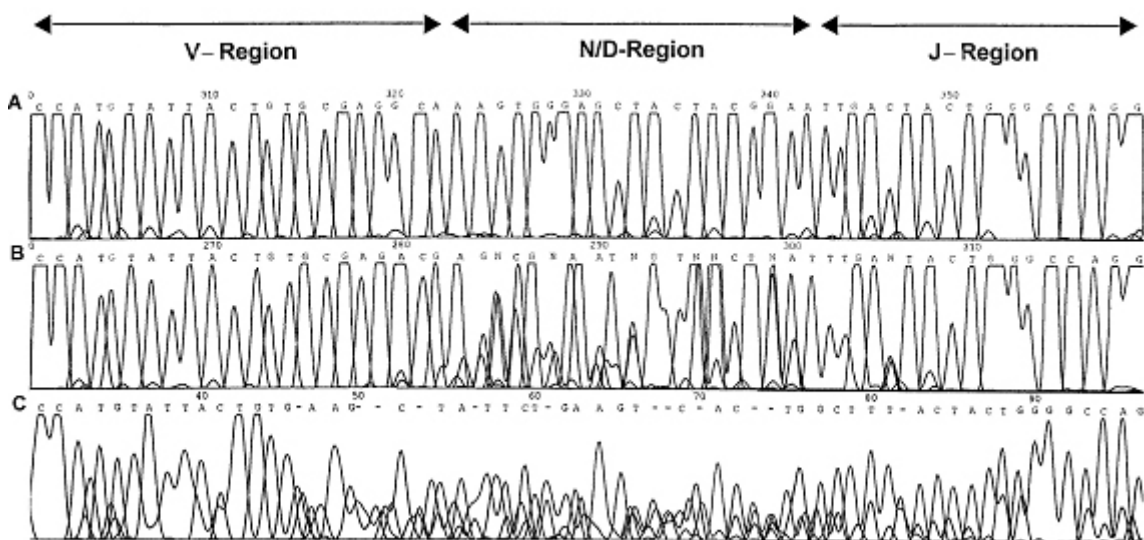


Abbildung 5: Vergleich der Chromatogramme nach Sequenzierung von CDR3-Banden

- A) Dominante Bande, welche ein singuläres Transkript enthält
- B) Dominante Bande, welche 3-4 verschiedenen Transkripte enthält
- C) Bande aus einem polyklonalen Repertoire, die multiple Transkripte übereinstimmender CDR3-Länge enthält

Zunächst musste die entsprechende Bande aus dem Gel isoliert und die darin enthaltenen Transkripte reamplifiziert werden. Nach einer besonderen Reinigung der PCR-Produkte erfolgte die Sequenzierung. Diese Arbeitsschritte werden in den folgenden Unterkapiteln genauer erklärt.

3.6.1 Isolierung und Reamplifikation definierter DNA-Fragmente

Nachdem man die PAGE photographisch dokumentiert hatte, wurden Banden von besonderem Interesse, deren Nukleotidabfolge ermittelt werden sollte, aus dem Gel ausgeschnitten und das Material in jeweils 50 µl HPLC-H₂O (*MALLINCKRODT BAKER*) überführt und bei Raumtemperatur gelagert. Für die Reamplifikation der eluierten Banden wurden 5 – 10 µl der Fragmentpräparation als Matrize sowie die ursprünglich eingesetzten Oligonukleotidprimer in der Polymerase-Kettenreaktion (sh. 3.4) benötigt. Die Resultate wurden anschließend mittels Agarosegel-Elektrophorese validiert (sh. 3.4.1).

3.6.2 Präparation von Sequenziermatrizen

Die aus einer bestimmten Bande der PAGE stammenden Reamplifikate mussten einer Modifikation unterzogen werden, damit sie als Matrizenmoleküle in Sequenzierreaktionen eingesetzt werden konnten. Dies betraf sowohl Reamplifikate der nicht-klonierten, dominanten DNA-Banden, die direkt aus der PAGE isoliert wurden, als auch der klonierten PCR-Produkte.

Wir verwendeten das „*QIAquick™ PCR Purification Kit*“ (*QIAGEN GmbH*, Hilden, FRG), dessen Prinzip die Ionenaustauscher-Chromatographie darstellt. Mit diesem Verfahren wurde eine Reinigung von PCR-Produkten in einem Größenbereich von 0,1 bis 10 kb gewährleistet. Höhermolekulare Nukleinsäuren adsorbierten im Gegensatz zu Oligonukleotiden unter 40 bp bei einem p_H-Wert ≤ 7,5 an das Material der *QIAquick™*-Säulen. Ein daran angeschlossener Waschschrift mit 750 µl ethanolhaltigem Spezialpuffer entfernte niedermolekulare Nukleinsäuren, freie Nukleotide und anorganische Salze. Im letzten Schritt eluierte man die an der Säule haftenden PCR-Produkte durch Zugabe von 30 – 50 µl TE-Puffer sowie Zentrifugation bei 20.800 g (Mikrozentrifuge *EPPENDORF 5417*). Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Aufbewahrung bei 4 °C.

3.6.3 DNA-Sequenzierung nach dem Kettenabbruchverfahren mit Hilfe farbstoffkodierter 2',3'-Dideoxynukleotide

Das Prinzip dieser Technik basierte auf der von *Sanger et al.* (155) etablierten Methode einer *de novo* Synthese von DNA, welche komplementär zum jeweils vorliegenden Matrizenstrang ist.

Ausgehend von kurzen, spezifisch hybridisierenden Start-Oligonukleotiden resultierte der mit statistischer Wahrscheinlichkeit erfolgende Einbau Fluoreszenzfarbstoff-markierter 2',3'-Dideoxynukleotide im Abbruch der durch eine modifizierte *Taq* Polymerase katalysierten DNA-Synthese. Parallel dazu lief eine lineare Amplifikation der DNA-Moleküle ab, die der Polymerase-Kettenreaktion ähnlich war. Die Farbstoff-Terminatoren-Sequenzierung der dsDNA erfolgte unter Verwendung des *ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzers (PE APPLIED BIOSYSTEMS)*. Diese Technik bedurfte keiner Durchführung separater basenspezifischer Reaktionen, da die eingesetzten ddNTPs an unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt waren. Außer den Oligonukleotidprimern (vgl. 3.4), waren alle benötigten Reagenzien im gebrauchsfertig bezogenen *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits* enthalten. Alle Markierungsansätze enthielten pro 20 µl Volumen 3,8 µl *ABI-Ready Reaction Mix FS™* sowie 3,8 pmol des jeweils benötigten Oligonukleotids und 1 µl der jeweiligen DNA-Matrizenpräparation. Die Sequenzierungsreaktionen wurden in 200 µl fassenden Mikroreaktionsgefäßen unter Gebrauch der Thermocycler *GeneAmp® PCR System 2400 bzw. 9700* durchgeführt.

physikalische Versuchsparmeter

96° C 1' ⇒ initiale Denaturierung

96° C 30'' ⇒ Denaturierung der Matrize

50° C 15'' ⇒ Anneraling der Primer

60° C 4' ⇒ Markierungs-/Synthesephase (30 Zyklen)

4° C ∞

Die Reaktionsdauer betrug 3 Stunden. Im Anschluß wurde die endmarkierte DNA gemäß des „Ethanol Precipitation Protocol I“ gefällt, mit dem Ziel sämtliche Kontaminationen zu eliminieren. Es folgte die Aufnahme in 20 µl

TSR™ (*PE APPLIED BIOSYSTEMS*) und zum Schluß zwecks thermischer Denaturierung eine Inkubation bei 97 °C für 3 Minuten.

3.6.4 Generierung von Nukleotid-Sequenzdaten

Anhand des *ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer* war die Durchführung vollautomatisierter DNA-Sequenzanalysen möglich. Es wurden hierbei die markierten DNA-Moleküle mit elektrischen Feldstärken von 160 - 200 V x cm⁻¹ sowie Stromstärken von 7 - 10 µA kapillar-elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgte nach Durchlaufen eines Spektrographen die Registrierung emittierter Signale durch ein „high performance“ CCD-Detektionssystem, nachdem endständigen Fluoreszenzfarbstoffe mittels eines Argon-Lasers ($\lambda = 488$ bzw. 514 nm) angeregt wurden. Die auf diese Weise ermittelten *ABI*-Primärdaten ließen sich nach Import in einen PC mittels spezieller Software (*Chromas™ 1.51*, *TECHNELYSIUM Pty Ltd.*, GB; Internet: <http://www.technelysium.com.au/>) analysieren und in Form farbiger Chromatogramme ausdrucken (*HP Deskjet 690 C*, *HEWLETT-PACKARD*, Böblingen).

3.6.5 EDV-gestützte Verarbeitung von DNA-Sequenzdaten mit anschließender CDR3 Längenanalyse

Zur Analyse der Nukleotidsequenzen bedienten wir uns des *Omiga™*-Programms (*OXFORD MOLECULAR LTD.*, Cambridge, U.K). Mit dem Ziel, die CDR3 Längen berechnen zu können, wurden zunächst die DNA-Sequenzen der δ Kettentranskripte in die korrespondierende Aminosäuresequenz translatiert. Die CDR3 Länge wurde von der Anzahl der Aminosäuren bestimmt, die sich zwischen dem konservierten Cystein C, welches nahe dem 3' Ende der TCRDV Region kodiert war und dem konservierten GXG Triplet, welches in allen TCRDJ Regionen kodiert war, befanden. Um die endgültige CDR3 Länge zu erhalten, mussten von dieser Zahl noch 8 Aminosäuren subtrahiert werden (89). Demzufolge betrug die Länge der CDR3 Region der TCRD4 Sequenz: CAVTKTTWRYDTDKLIFGKG, die 20 Aminosäuren lang ist, 12 Aminosäuren (20-8=12).

3.7 Indirekte Sequenzanalyse der TCR δ Transkripte nach Subklonierung

Wie bereits im Punkt 3.5 erwähnt, ergab die Sequenzanalyse im Falle eines polyklonalen TCR δ Repertoires oftmals keine lesbaren Nukleotidabfolgen. Der Grund dafür lag darin, daß eine singuläre Bande mehrere TCR δ Transkripte beinhaltete, die zwar die gleiche CDR3 Länge aufwiesen, aber unterschiedliche Basenabfolgen besaßen. Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 5 veranschaulicht. Um diese unterschiedlichen Transkripte voneinander zu trennen, führte man eine *indirekte* Sequenzierung durch, indem man vor die Sequenzanalyse eine Subklonierung schaltete. Als erstes musste, wie bei der *direkten* Sequenzierung im Falle eines oligoklonalen Bandenmusters auch, die entsprechende Bande aus dem Gel isoliert und die darin enthaltenen Transkripte reamplifiziert werden (3.6.1).

3.7.1 Subklonierung von Rezeptortranskripten einer bestimmten CDR3 Länge

Mit dem Ziel, die in einer definierten Bande einer bestimmten Länge vorhandenen Rezeptortranskripte voneinander zu trennen, verwendeten wir das Verfahren der Subklonierung mittels eines T-Vektor-Klonierungssystems. Nachdem modifizierte PCR-Produkte mit linearisierten Klonierungsvektoren ligiert wurden, konnte man diese rekombinanten Produkte in äquimolare prokaryontische Rezipienten (*E. coli*) einschleusen. Jene, bei denen die Transformation stattgefunden hatte, ließen sich anhand eines bestimmten Detektionssystems identifizieren (sh. 3.7.2). Anschließend fungierten jene Einzelkolonien transformierter *Escherichia coli*-Klone als Matrize für die nachfolgende Polymerase-Kettenreaktionen, um eine Vervielfältigung der „Insert“-DNA zu gewährleisten. Die somit erhaltenen PCR-Produkte konnten nun sequenziert werden (sh. 3.6.3).

3.7.2 Das „T-Vektor“-Klonierungssystem

Zur Verwendung kam das „*Original TA Cloning*[®] *Kit*“ (*INVITROGEN*[®] BV, Leek, Niederlande), das den linearisierten, 3,9 kb großen Vektor *pCR*[®]2.1 (*INVITROGEN*[®]) beinhaltet, der singuläre, 3'-terminal lokalisierte (d)T-Überhänge besaß. Bei diesem System war es möglich, die mittels zuvor erwähnten Standard-Primern synthetisierten PCR-Produkte ohne weitere Vorbereitung direkt zu subklonieren.

Die *Taq* DNA Polymerase verfügte über eine intrinsische TdT-Aktivität, was zur Synthese von doppelsträngiger DNA-Amplikons führte, die 3'-terminale (d)A-Additionen besaßen. Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften des T-Vektors und der PCR-DNA wurde die entsprechende inverse Orientierung des Inserts ermöglicht.

Das zuvor erwähnte Detektionssystem positiver Transformationssysteme bestand aus einer blau/weiß-Selektion, die durch das Vermögen des Vektors *pCR*[®]2.1, eine α -Komplementation einer N-terminal deletierten β -Galaktosidase durchzuführen, gewährleistet wurde. Neben der β -Laktamase (Ampicillin/Carbenicillin-Resistenz) kodierte *pCR*[®]2.1 für eine Aminoglykosid-Phosphotransferase-Aktivität, welche Kanamycinresistenz verlieh.

Das TA-Klonierungssystem sieht die Verwendung des *Escherichia coli*-Rezipientenstammes INVaF⁻ vor.

3.7.3 Generierung rekombinanter Plasmide durch Ligation

Folgende Abbildung veranschaulicht die Generierung rekombinanter Plasmide durch Rekombination:

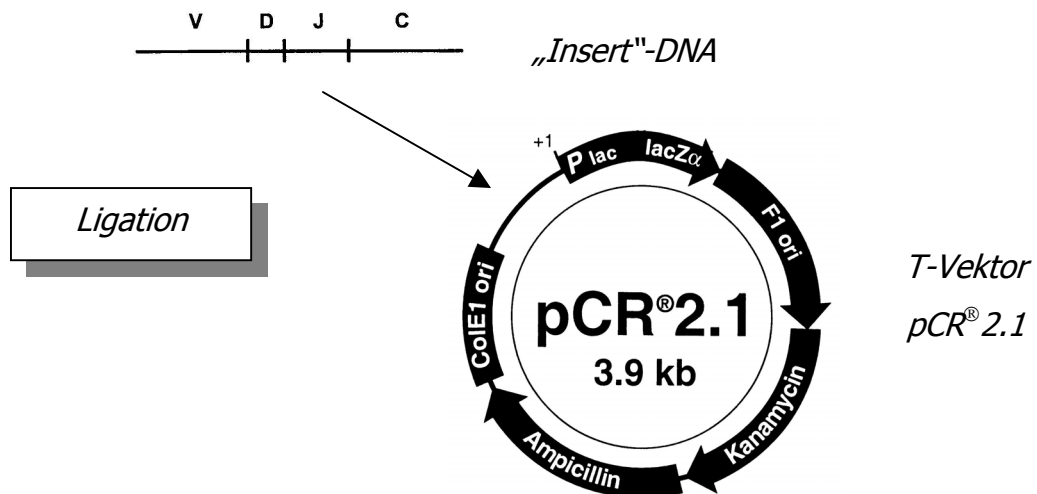


Abbildung 6: Ligation von „Insert“-DNA mit dem linearen T-Vektor *pCR[®] 2.1*

Bei Verwendung des *TA Cloning[®] Kits* enthielten die Ligationsansätze annähernd äquimolare Verhältnisse von Insert- und Vektor- DNA (je 30 – 60 ng). Das für die Ligation zuständige Enzym *T₄ DNA Ligase (NEB[®])* stammte aus dem Bakteriophagen *T₄*. Für den Ligationsansatz wurden 4 *Weiss* Units benötigt, zudem war dessen katalytische Aktivität an die Verfügbarkeit von 1 mM (d)ATP gebunden.

chemische Parameter

Insert (<i>NotI/SalI</i>)	30 – 60 ng
<i>T</i> -Vektors“ <i>pCR[®] 2.1</i> (<i>NotI/SalI</i>)	30 – 60 ng
<i>T₄</i> -DNA Ligase	4 <i>Weiss</i> U
dATP	1 mM
BSA	250 ng
DTT	10 mM

physikalische Parameter

15° C	10 h
-------	------

MgCl ₂	10 mM
Tris-/HCl p _H = 7,5 (25°C)	50 mM

Ligationen zwischen kohäsiven DNA-Fragmentenden erfolgten vorzugsweise bei Temperaturen von 14 - 15°C unter Nutzung eines Thermalcyklers (*GeneAmp[®] PCR System 2400, PE APPLIED BIOSYSTEMS*), wobei die Inkubationsdauer zwischen 4 h und 16 h variierte. Die Inaktivierung des Enzyms konnte alternativ durch Zugabe von 2 µl 500 mM EDTA (*SIGMA*) oder 10 minütige Inkubation des Reaktionsansatzes bei 75°C erreicht werden.

3.7.4 Transformation von *Escherichia coli* Rezipientenstämme

Alle nachfolgend beschriebenen gentechnischen Arbeiten wurden im S₁-Bereich des Gastroenterologischen Funktionslabors der *Johann Wolfgang Goethe*-Universität Frankfurt am Main durchgeführt.

Zur Selektion rekombinanter Transformanten wurden je 50 µl der Zellsuspensionen auf *LB*-Medium (*LIFE TECHNOLOGIESTM*) ausplattiert. Dieses enthielt 60 ppm Carbenicillin (α -Carboxypenicillin), 40 ppm X-Gal und 20 ppm IPTG (alle *SERVA*, Heidelberg). Es folgte die Inkubation bei 37°C (*BB 6220, HERAEUS INSTRUMENTS*) über Nacht.

Zufällig ausgewählte Kolonien positiver *E.coli* Transformantenklone wurden direkt als Matrize in Polymerase-Kettenreaktionen eingesetzt. Auf diese Weise ließ sich die Insert-DNA unter Einsatz sequenzspezifischer Oligonukleotide amplifizieren (sh. Abb.3).

Die folgenden Schritte waren mit denen der direkten Sequenzierung identisch. Die klonierten PCR-Amplifikate wurden dem in 3.6.2 beschriebenen Reinigungsverfahren unterzogen, damit man sie als Matrizenmoleküle in Sequenzierreaktionen (sh. 3.6.3) einsetzen konnte. Es folgte die DNA-Sequenzdatenverarbeitung und CDR3 Längenanalyse, die den Kapiteln 3.6.4 und 3.6.5 zu entnehmen sind.

4. Ergebnisse

In vorangegangenen Studien wurden die Veränderungen des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor (TCR) Repertoires im menschlichen Darm charakterisiert, die während der Entwicklung vom Feten zum Erwachsenen stattfinden. Um mehr über die Funktionen der $\gamma\delta$ T Zellen und die Mechanismen, die deren TCR δ Repertoire kontrollieren, zu erfahren, bedarf es weiterer Untersuchungen. Wie bereits in der Einleitung dargestellt, hatte sich das Schwein als ein geeignetes Tiermodell herausgestellt.

In dieser Arbeit nun konzentrierten wir uns zum einen auf die pränatale Entwicklung des TCR δ Repertoires und eine eventuelle Kompartimentierung beim Schwein. Demnach dient ein Teil der Experimente dem Vergleich zwischen den fetalen TCR δ Repertoiren von Mensch und Schwein. Hierfür erhielten wir von fetalen Schweinen, deren Alter sich zwischen dem 38. Tag und 114. Tag der Tragzeit belief, folgende Proben: Dün- und Dickdarm, Milz, Thymus, Leber, Knochenmark und periphere Blutzellen (sh. 3.1).

Ein anderer Teil der Experimente galt Untersuchungen zu einem möglichen Selektionsdruck auf das postnatale TCR δ Repertoire, ausgelöst durch Mikroorganismen. Hierbei dienten uns 10 Wochen alte Schweine als Versuchstiere, die unter keimfreien(GF)- bzw. spezifisch-Pathogen-freien(SPF) Bedingungen aufgezogen wurden; sogenannte GF- bzw. SPF-Schweine. Das mukosale Immunsystem der spezifisch-Pathogen-freien Schweine (SPF) ist vergleichbar mit jenem von konventionell gehaltenen Schweinen, außer daß deren Darmflora frei von pathogenen Keimen ist. Es standen uns jeweils folgende Proben zu Verfügung: Dün- und Dickdarm, mesenteriale Lymphknoten, Milz und Thymus (sh. 3.1).

Insgesamt bestand unser Vorgehen darin, daß das TCR δ Repertoire von allen Gewebeproben in den fünf bekannten V δ Familien untersucht wurde. Es wurden zunächst TCRDV1 – DV5 Transkripte mittels RT-PCR amplifiziert, woran sich eine CDR3 Längenanalyse mittels denaturierender Polyacrylamid-Gele anschloss. Anhand dieses Verfahrens wurden die PCR-Amplifikate der

Größe nach aufgetrennt. Das resultierende Verteilungsmuster spiegelte das jeweilige TCR δ Repertoire eines bestimmten Organs wider. Somit erlaubte diese Methode eine direkte optische Beurteilung der Diversität der einzelnen TCR δ Repertoires. Zudem konnte durch optischen Vergleich Überlappungen zwischen den Repertoiren unterschiedlicher Organe aufgedeckt werden. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens bestand darin, daß Banden von besonderem Interesse aus dem Gel ausgeschnitten werden konnten. Handelte es sich dabei um eine Bande aus einem oligoklonalen Muster, so konnte diese im Anschluß direkt sequenziert werden. Lag aber ein polyklonales Bandenmuster, so musste zunächst eine Subklonierung durchgeführt werden. So konnte nicht nur die exakte Nukleotidabfolge ermittelt, sondern auch herausgefunden werden, ob es sich bei Banden gleicher Länge um die gleichen Sequenzen handelte.

Es sei angemerkt, dass zur Vereinfachung statt z. B. TCRDV3 die kürzere Bezeichnung DV3 oder V δ 3 verwendet werden kann. Die ersten drei Buchstaben „TCR“ stehen für T-Zell-Rezeptor.

4.1 Pränatale Entwicklung des TCR δ Repertoires des Schweins

Ein invariables DV3 Transkript ist in Milzen verschiedener fetaler Schweine vertreten

Zu Beginn analysierten wir die Diversität des TCR δ Repertoires der Milz von je drei Feten des 70., 90. und 110. Tages der Tragzeit (TZ). Aus Abbildung 7 läßt sich ableiten, daß das Repertoire der Familien DV1, DV4 und DV5 ein diverses Muster zeigte, wohingegen das der DV3 Familie bei TZ70 stark eingeschränkt war.

Bei allen drei verschiedenen Feten von TZ70 war eine dominante Bande mit einer CDR 3 Länge von 9 Aminosäuren vorhanden. Anzumerken ist, daß das Profil der DV3 Familie von TZ90 und TZ110 eine höhere Diversität aufwies.

Mittels Klonierung und Sequenzierung der DV3 Banden der Länge von 9 Aminosäuren konnten wir ein invariables DV3 Transkript in allen analysierten Feten ermitteln (Abb. 8, Sequenz 8374-3). Dieses Transkript wies keine N/D Region auf und gebrauchte das Gen-Segment DJ3. Es war häufig bei TZ70 nachweisbar; bei TZ90 und TZ110 hingegen war es weniger oft vertreten. Zudem erhielten wir das invariable DV3 Transkript mittels direkter Sequenzierung der dominanten Banden bei allen drei Feten (I, II, III) von TZ70. Dies war nicht möglich für die älteren Feten von TZ90 und TZ110. Die Aminosäure-Sequenzen der translatierten DV3 Transkripte werden in Abbildung 9a gezeigt.

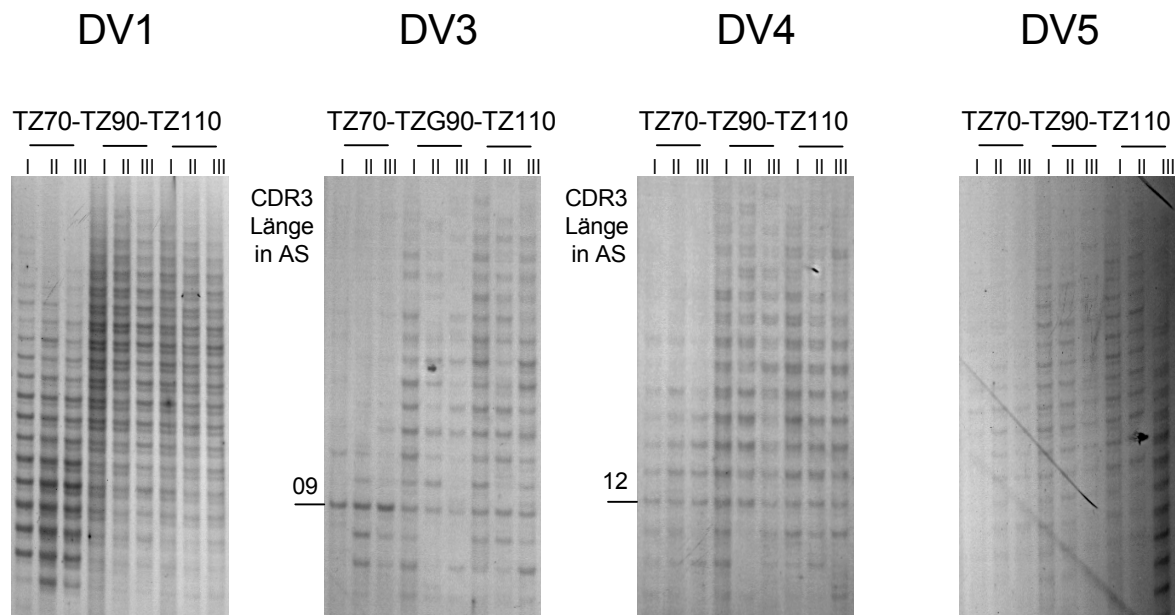


Abbildung 7: CDR3 Längenanalyse von DV1, DV3, DV4 und DV5 Transkripten von Milzen drei fetaler Schweine (I,II,III) der Tragzeiten TZ70, -90, -110. Dominante DV3 Banden mit einer Länge von 9 konnten bei allen drei Feten von TZ70 gesehen werden. Einige Banden, versehen mit der CDR3 Länge an den Seiten der Gele, wurden ausgeschnitten, kloniert und sequenziert (Abb. 8). Die durchschnittliche CDR3 Länge von TZ70 ist unabhängig der DV Familie im Vergleich zu TZ90 und TZ110 kürzer.

Abbildung 8: Junktionale Sequenzen von DV3 (oben) und DV4 (unten), die von Milzen der fetalen Schweine von TZ70, -90, -110 stammen. DV3 Banden mit einer CDR3 Länge von 9 und DV4 Banden mit einer CDR3 Länge von 12 wurden ausgeschnitten (aus Abb. 7), reamplifiziert, geklont und sequenziert. Die Zahlen auf der rechten Seite beziehen sich auf die Fraktion der Transkripte, die die angegebene CDR3 Region tragen. Zum Beispiel wurde die erste DV3 Sequenz (8374-3) in allen analysierten Proben der Milzen detektiert (TZ70 I und II, TZ90 I und TZ110 I). Genomsequenzen erscheinen fett gedruckt zu oberst in der Abbildung. Die gesamte Sequenz-Länge der DV und DD Gen-Segmente ist unbekannt und, basierend auf Sequenz-Homologien, abgeschätzt. Sequenzen, die die mögliche DD4 Region enthalten, sind unterstrichen. Die Aminosäure-Sequenzen der translatierten TCR δ Transkripte werden in Abb. 9a gezeigt

CDR3- Länge	Se- quenz	TCRDV	N	DD1 ACAGCTACGTGGAC	N	DD2 GGGGTTGGTAC	N	DD3 GGTGGATACA	N	ATGATACAGATAAACTCATC DJ1 CTCCTGGGACACCCGACAGA DJ3 CATCTCCACTGACATTCGG DJ4	Milz TZ90 TZ110
09	8374-3	TGTCGTTTCTGGGA	DV3							CTCCTGGGACACCCGACAGA DJ3 3/5 1/4 1/4 1/4 1/15	
09	8374-2	TGTGCTTTCTGGGA		CTA					CTGGGACACCCGACAGA DJ3 1/5 1/4		
09	8374-1	TGTGCTTTCTGG							AGGTATCG	TGATACAGATAAACTCATC DJ1 1/5	
09	8376-7	TGTGCTTTCTGG		AGC	A	GGT				ATGATACAGATAAACTCATC DJ1 1/4	
09	8376-8	TGTGCTTTCTGG	AA					GGGAT		ATGATACAGATAAACTCATC DJ1 1/4	
09	8376-9	TGTGCTTTCTGGGA		CTAC					GGTATCG	CAGATAAACTCATC DJ1 1/4	
09	8377-3	TGTGCTTTCTGGGA	CT	ACAGCTACGTGGA					GG	CACTGACATTCGG DJ4 2/4	
09	8379-1	TGTGCTTTCTGGGA		CTACGT	AC			GGTGG		GATAAACTCATC DJ1 3/15	
09	8379-2	TGTGCTTTCTG		CTACGTGGAC		TGCTAC	GC			TAAACTCATC DJ1 2/15	
09	8379-10	TGTGCTTTCTGGGA		CAGCTAC	A	GTTGG				GATAAACTCATC DJ1 2/15	
09	8379-16	TGTGCTTTCTGGGA	AC			TTGGTA		GGT		ATCTTCCACTGACATTCGG DJ4 2/15	
09	8379-3	TGTGCTTTCTGGGA		CTAC	AGCT			GGTGGATA		CACTGACATTCGG DJ4 1/15	
09	8379-4	TGTGCTTTCTGGGA	CAACACAG							GATAAACTCATC DJ1 1/15	
09	8379-6	TGTGCTTTCTGGGA	CA	TACG	ACA			GGA	G	GATAAACTCATC DJ1 1/15	
09	8379-11	TGTGCTTTCTGGGA		TACG				GGA	GG	GATAAACTCATC DJ1 1/15	
09	8379-15	TGTGCTTTCTGGGA		CTACG	AT	TTGG	AG			GATAAACTCATC DJ1 1/15	
12	8381-1	TGCGCTGTCACA	AAAA	CTACGTGA		GGT				ATGATACAGATAAACTCATC DJ1 4/9	
12	8381-2	TGCGGTGTCACAG	A			GGT	GC	GGA	G	CTCCTGGGACACCCGACAGA DJ3 2/9	
12	8381-4	TGCGGTGTCACAG		CTAC		TTGGTAC			CGGT	ATGATACAGATAAACTCATC DJ1 1/9	
12	8381-14	TGCGGTGTCACAG	T	ACAGCTAG				GGA	CGGG	TACAGATAAACTCATC DJ1 1/9	
12	8381-12	TGCGGTGTCACAG	AGGT	GTGGA					GG	TCCTGGGACACCCGACAGA DJ3 1/9	
12	8383-5	TGCGGTGTCACAG		CTACGTGGA					GG	TCCTGGGACACCCGACAGA DJ3 2/8	
12	8383-3	TGCGGTGTCACAG		CAGCTACGT					ATC	CTTGGGACACCCGACAGA DJ3 2/8	
12	8383-1	TGCGGTGTCAC		ACAGCTACGTGGA						TCCTGGGACACCCGACAGA DJ3 1/8	
12	8383-13	TGCGGTGTCACAG	CA	ACGT					CAAG	CTCCTGGGACACCCGACAGA DJ3 1/8	
12	8383-11	TGCGGTGTCACA	CA			GGTAC			CGAGA	TCCTGGGACACCCGACAGA DJ3 1/8	
12	8383-4	TGCGGTGTCACAG							AGGTATCG AG	CTCCTGGGACACCCGACAGA DJ3 1/8	
12	8384-2	TGCGGTGTCACAG	ATCTGC					GGTGG	ACCCAAAGCAG	GATAAACTCATC DJ1 1/7	
12	8384-3	TGCGGTGTCACAG		AGCTACGTGG	TTG			GGTGGGAT	GGT	ATAAACTCATC DJ1 1/7	
12	8384-4	TGCGGTGTCACAG		AGC				GTGGGATAC	GAGGAGG	TACAGATAAACTCATC DJ1 1/7	
12	8384-5	TGCGGTGTCACAG	AG	GTG	C	GGTTGGTAC			GG	GATACAGATAAACTCATC DJ1 1/7	
12	8384-14	TGCGGTGTCACAG		CTACGT		GGGGGT	ACAGCTGGTAC	GTGGGATACA	GG	-0 DJ1 1/7	
12	8384-15	TGCGGTGTCACAG	T	ACAGCTAC		GGGGGT		GGT		ATACAGATAAACTCATC DJ1 1/7	
12	8384-12	TGCGGTGTCACAG	AGGTCGGT	ACAGCTAC						GATACAGATAAACTCATC DJ1 1/7	

Abbildung 8: Funktionale Sequenzen der fetalen Schweine TZ70, -90, -110

a)

CDR3- Länge	Se- quenz	TCRDV	N/D	DTDKLIFGKG DJ1 SWDTRQMYFGAG DJ3 HLPLTFGQG DJ4
DV3				
09	8374-3	LADSARYFCAFW		SWDTRQMYFGAG DJ3
09	8374-2	LADSARYFCAFW	Y	WDTRQMYFGAG DJ3
09	8374-1	LADSARYFCAFW	RYR	DTDKLIFGKG DJ1
09	8376-7	LADSARYFCAFW	SRY	DTDKLIFGKG DJ1
09	8376-8	LADSARYFCAFW	KGY	DTDKLIFGKG DJ1
09	8376-9	LADSARYFCAFW	YGIA	DKLIFGKG DJ1
09	8377-3	LADSARYFCAFW	YSYVEA	LTFGQG DJ4
09	8379-1	LADSARYFCAFW	YVRW	DKLIFGKG DJ1
09	8379-2	LADSARYFCAF	CYVDWYA	KLIFGKG DJ1
09	8379-10	LADSARYFCAFW	YSW	DKLIFGKG DJ1
09	8379-16	LADSARYFCAFW	ELGRY	LPLTFGQG DJ4
09	8379-3	LADSARYFCAFW	YSWWDT	LTFGQG DJ4
09	8379-4	LADSARYFCAFW	NDRW	DKLIFGKG DJ1
09	8379-6	LADSARYFCAFW	IRQE	DKLIFGKG DJ1
09	8379-11	LADSARYFCAFW	TGG	DTDKLIFGKG DJ1
09	8379-15	LADSARYFCAFW	YDLE	DKLIFGKG DJ1
DV4				
12	8381-1	LSDSDVYFCAVT	KTWRY	DTDKLIFGKG DJ1
12	8381-2	LSDSDVYFCAVT	EVRS	SWDTRQMYFGAG DJ3
12	8381-4	LSDSDVYFCAVT	ATWYAY	DTDKLIFGKG DJ1
12	8381-14	LSDSDVYFCAVT	VQLRGRG	TDKLIFGKG DJ1
12	8381-12	LSDSDVYFCAVT	EVWR	SWDTRQMYFGAG DJ3
12	8383-5	LSDSDVYFCAVT	ATWR	SWDTRQMYFGAG DJ3
12	8383-3	LSDSDVYFCAVT	AATYP	WDTRQMYFGAG DJ3
12	8383-1	LSDSDVYFCAVT	QLRG	SWDTRQMYFGAG DJ3
12	8383-13	LSDSDVYFCAVT	ATNS	SWDTRQMYFGAG DJ3
12	8383-11	LSDSDVYFCAVT	QVPR	SWDTRQMYFGAG DJ3
12	8383-4	LSDSDVYFCAVT	AATYP	WDTRQMYFGAG DJ3
12	8384-2	LSDSDVYFCAVT	DLRWTPKQDQ	LIFGKG DJ1
12	8384-3	LSDSDVYFCAVT	ELRGWVGWY	KLIFGKG DJ1
12	8384-4	LSDSDVYFCAV	REGIRGG	TDKLIFGKG DJ1
12	8384-5	LSDSDVYFCAV	REVRVLR	DTDKLIFGKG DJ1
12	8384-14	LSDSDVYFCAVT	ATWGYSWYVGYR	FGKG DJ1
12	8384-15	LSDSDVYFCAVT	VQLRGWY	TDKLIFGKG DJ1
12	8384-12	LSDSDVYFCAVT	EVRYSY	DTDKLIFGKG DJ1

Abbildung 9 a): Aminosäure-Sequenzen der translatierten TCR δ Transkripte aus Abb. 8

b)

CDR3- Länge	Se- quenz	TCRDV	N/D	DTDKLIFGKG SWDTRQMYFGAG HLPLTFGQG	DJ1 DJ3 DJ4
DV1					
11	8503	MKDSATYFCAIW	ELATWRR	LPLTFGQG	DJ4
07	8502	PEDSAKYFCALR	GTGG	PLTFGQG	DJ4
DV2					
06	8524	LEDAGVYFCAYS	A	TDKLIFGKG	DJ1
14	8674	LEDAGVYFCAYS	ATWKSVMGYR	HLPLTFGKG	DJ4
14	8525	LEDAGVYFCAYS	ARGWYGIE	DTDKLIFGKG	DJ1
11	8530	LEDAGVYFCAYS	TATWY	DTDKLIFGKG	DJ1
03	8529	LEDAGVYFCAYS	A	LTFGKG	DJ4
DV3					
09	8374-3	LADSARYFCAFW		SWDTRQMYFGAG	DJ3
09	8374-3	LADSARYFCAFW		SWDTRQMYFGAG	DJ3
09	8374-3	LADSARYFCAFW		SWDTRQMYFGAG	DJ3
09	8374-3	LADSARYFCAFW		SWDTRQMYFGAG	DJ3
DV4					
12	8686	LSDSDVYFCAVT	EARYR	WDTRQMYFGAG	DJ3
12	8695	LSDSDVYFCAVT	ATWG	SWDTRQMYFGAG	DJ3
09	8693	LSDSDVYFCAVT	DF	WDTRQMYFGAG	DJ3
09	8697	LSDSDVYFCAVT	VA	WDTRQMYFGAG	DJ3

Abbildung 9 b): Aminosäure-Sequenzen der translatierten TCR δ Transkripte aus Abb. 11.

Die ersten TCR δ Transkripte erscheinen bei TZ38

Als Nächstes untersuchten wir die Diversität des TCR δ Repertoires von verschiedenen Feten im Alter von TZ38 bis TZ114 (Abb. 10a und b). Wir stellten uns die Frage, ob das invariable DV3 Transkript auch in anderen Organen bzw. früh während der Tragzeit vertreten ist. Ferner wollten wir die Entwicklung des TCR δ Repertoires im Verlauf der Tragzeit charakterisieren und die Frage nach einer Kompartimentierung klären.

Fax-Analysen hatten gezeigt, daß die ersten γ/δ T-Zellen im Thymus um TZ40 herum erscheinen (130; 135). Die Tragzeit beim Schwein dauert 114 Tage an. Bei TZ38 gelang uns kaum die Amplifizierung jeglicher TCR δ Transkripte, so daß wir nur in einigen Fällen bei der CRD3 Längenanalyse monoklonale

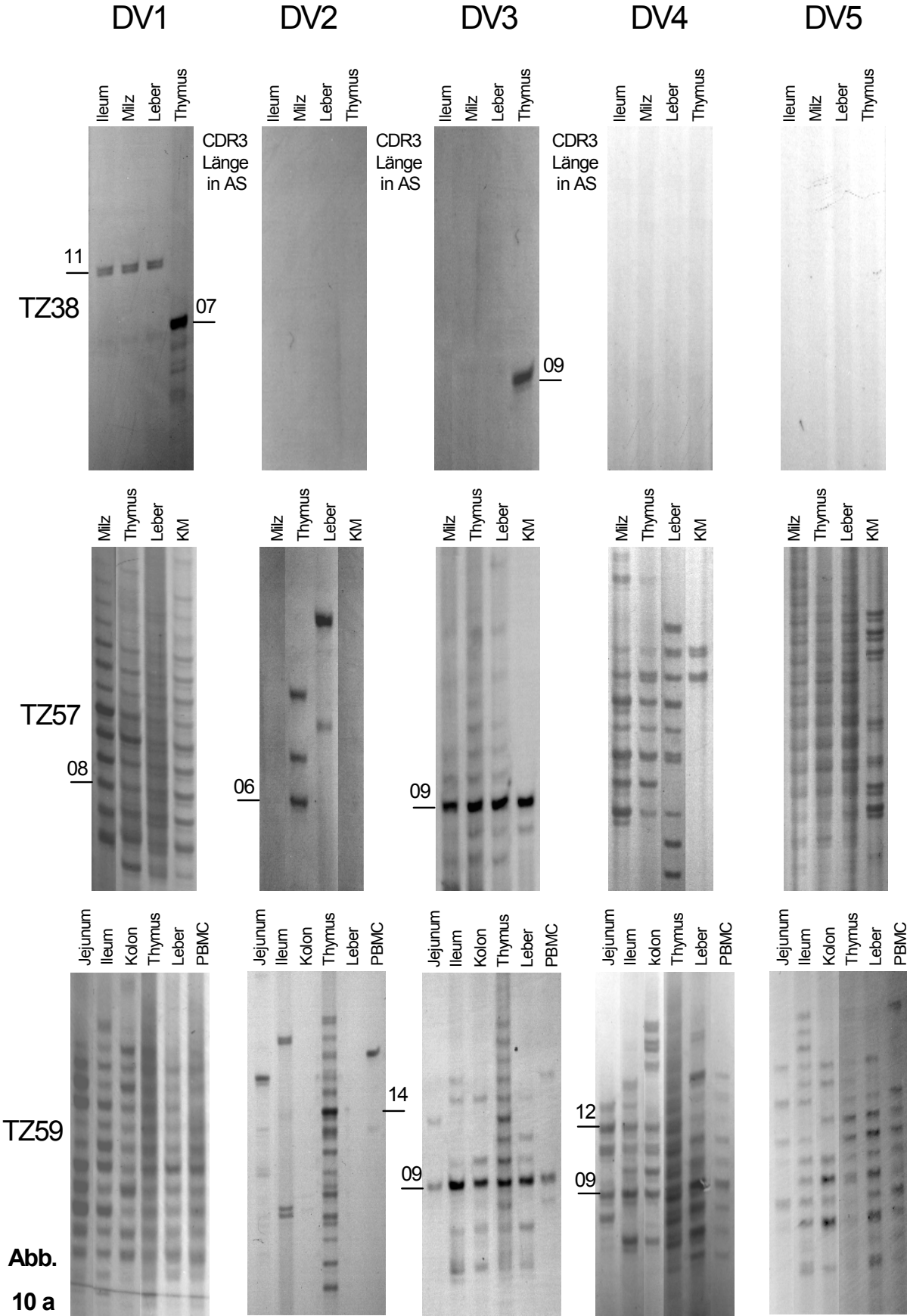
Banden von DV1 und DV3 erhielten (Abb. 10a). Trotz Wiederholung der PCR mit der zehnfach höheren Menge an cDNA, kamen wir zu denselben Ergebnissen. Den Nachweis, daß die cDNA intakt war, lieferten uns gute Amplifikationsresultate, die wir nach der PCR Amplifikation dieser Proben mit β -Aktin, welches ein „house-keeping“-Gen darstellt, erhielten. Dies läßt den Schluss zu, daß der Grund für die mangelhafte Detektion der TCR δ Transkripte von TZ38 in dem raren Auftreten der γ/δ T-Zellen in diesem frühen Tragzeitalter zu finden ist (130; 135).

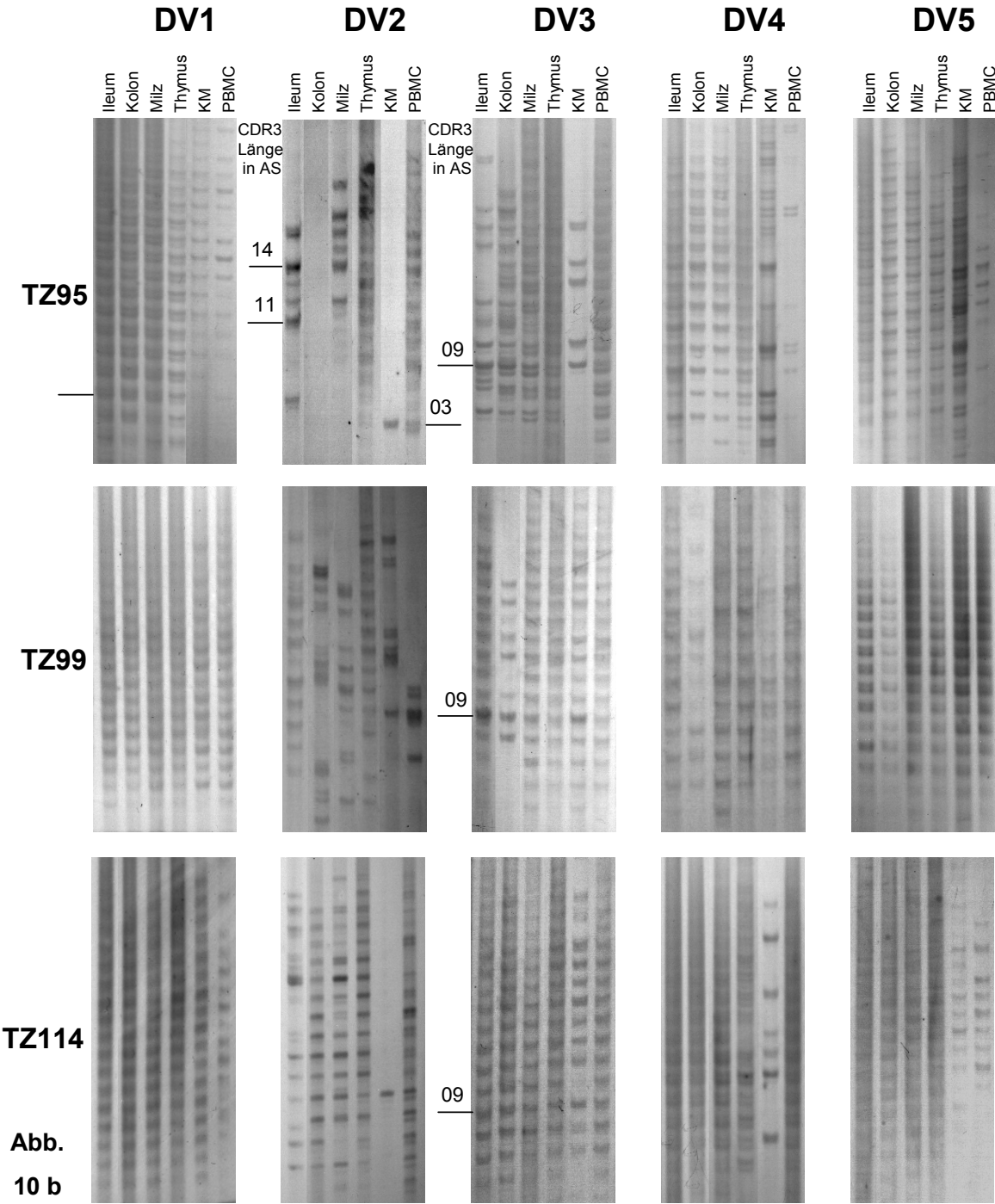
Die direkte Sequenzierung der monoklonalen DV1 Banden von TZ38 (Abb. 11; Sequenz 8503) ergaben das gleiche Transkript in Ileum, Milz und Leber, wohingegen das DV1 Transkript des Thymus sich von diesem unterschied (Sequenz 8502).

Interessanterweise beinhaltet die monoklonale DV3 Bande mit der CDR3 Länge von 9 vom Thymus von TZ38 exakt dasselbe invariable Transkript, welches wir zuvor in den Milzen der Feten von TZ70,-90 und -110 identifiziert hatten (Abb. 8, Sequenz 8374-3).

Abbildung 10: a) CDR3 Profile von DV1-DV5 Transkripten von drei Feten von TZ38, -57 und -59. TCR δ Transkripte von TZ38 konnten kaum nachgewiesen werden. Bitte beachte die dominante DV3 Bande mit der CDR3 Länge von 9, die in allen drei Schweinen vorhanden ist. Direktes Sequenzieren ergab für alle Organe dasselbe invariable DV3 Transkript (Abb. 11).

b) CDR3 Profile von DV1-DV5 Transkripten von drei Feten der TZ95, -99 und -114. Die DV3 Bande mit der CDR3 Länge von 9 war im Gegensatz zu jüngeren Feten weniger prominent. TCR δ Sequenzen von ausgewählten Banden, versehen mit der CDR3 Länge an den Seiten der Gele, sind in Abbildung 11, 12 und 15 aufgezeigt.





CDR3- Se-		ATGATACAGATAAACTCATC DJ1																								
Länge	quenz	TCRDV	N	DD1	DD2	DD3	N	CTCCTGGGACACCCGACAGA DJ3									CATCTTCCACTGACATTCCG DJ4 Dd				Kol	Mil	Thy	Leb	KM	PBMC
TZ38	11	D1	TGTGCTATCTGGG	AACT	AGCTACGTGGA	GGGTTGGTAC	GGG	GGA	CTTCCACTGACATTCCG DJ4	GG	CTTCCACTGACATTCCG DJ4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
	07																									TGTGCTCTCCGG
TZ57	06	D2	TGGCGCTTACAGT	GCC	GCGCTTTACAGT	GCTACGTGGA	AATC	GGGTTGGTAC	GGGAT	CGAG	GATACAGATAAACTCATC DJ1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
	14																									TGGCGTTACAGT
TZ59	14	D3	TGGCGTTACAGT	GCC	GCTACGTGGA	AATC	GGGTTGGTAC	GGGAT	CGAG	GATACAGATAAACTCATC DJ1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
	11																									TGGCGTTACAGT
TZ95	03	D3	TGGCGTTACAGT	GCC	GCTACGTGGA	AATC	GGGTTGGTAC	GGGAT	CGAG	GATACAGATAAACTCATC DJ1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
	03																									TGGCGTTACAGT
TZ38	09	D3	TGTGCTTTCTGGGA	AG	GCTA	CTACGTGG	GGG	GGGTTGGTAC	GGGAT	CGAG	GATACAGATAAACTCATC DJ1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
	09																									TGTGCTTTCTGGGA
TZ57	09	D3	TGTGCTTTCTGGGA	AG	GCTA	CTACGTGG	GGG	GGGTTGGTAC	GGGAT	CGAG	GATACAGATAAACTCATC DJ1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
	09																									TGTGCTTTCTGGGA
TZ59	09	D3	TGTGCTTTCTGGGA	AG	GCTA	CTACGTGG	GGG	GGGTTGGTAC	GGGAT	CGAG	GATACAGATAAACTCATC DJ1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
	09																									TGTGCTTTCTGGGA
TZ99	09	D3	TGTGCTTTCTGGGA	AG	GCTA	CTACGTGG	GGG	GGGTTGGTAC	GGGAT	CGAG	GATACAGATAAACTCATC DJ1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
	09																									TGTGCTTTCTGGGA
TZ59	12	D4	TGGCGTGTACAG	AG	GCTA	CTACGTGG	GGG	GGGTTGGTAC	GGGAT	CGAG	GATACAGATAAACTCATC DJ1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
	12		TGGCGTGTACAG	AG	GCTA	CTACGTGG	GGG	GGGTTGGTAC	GGGAT	CGAG	GATACAGATAAACTCATC DJ1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
	09		TGGCGTGTACAG	AG	GCTA	CTACGTGG	GGG	GGGTTGGTAC	GGGAT	CGAG	GATACAGATAAACTCATC DJ1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
	09		TGGCGTGTACAG	AG	GCTA	CTACGTGG	GGG	GGGTTGGTAC	GGGAT	CGAG	GATACAGATAAACTCATC DJ1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		

Das invariable DV3 Transkript dominiert in verschiedenen Organen während der Tragzeitmitte, wohingegen es in der späten Tragzeit seltener und zudem in kompartimentierter Form erscheint

Es wurde eine dominante DV3 Bande mit einer Länge von 9 Aminosäuren bei TZ57 und TZ59 gefunden, die in allen untersuchten Organen vorhanden war (Abb. 10a). Direkte Sequenzierung dieser Banden (Abb. 11) bestätigte, daß es sich hierbei um das invariable Transkript handelte, welches wir zuvor in den Milzen von TZ70-TZ110 (Abb. 8) und im Thymus von TZ38 (8374-3, Abb. 11) detektiert hatten. Hingegen konnte bei der Analyse der fetalen Schweine von TZ95, TZ99 und TZ114 ein fast vollständiges Verschwinden der Dominanz der DV3 Bande verzeichnet werden (Abb. 10b). Dennoch gelang es uns, diese Sequenz bei der Sequenzierung prominenter Banden mit der CDR3 Länge von 9 bei TZ95, 99 und 114 zu detektieren (Abb. 11 und 12).

In Hinblick auf die anderen DV Familien gab es keine dominanten Banden identischer Längen, die bei verschiedenen Organen vorhanden gewesen wären. Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß die Dominanz des invariablen DV3 Transkripts während der fetalen Entwicklung einzigartig ist.

Abbildung 12: Junktionale Sequenzen von DV3 Transkripten von Feten der TZ57, -95 und -114. Diese erhielt man durch Klonierung und Sequenzierung einzelner Banden, gekennzeichnet durch die CDR3 Längenangabe in Abb. 10. Siehe auch Legende der Abb. 8 und 11. Das invariable DV3 Transkript, dem die N/D Region komplett fehlt, war bei allen drei Feten vertreten (erste fett gedruckte Sequenz). Allerdings konnte dieses nicht im Thymus der älteren Schweine von TZ95 und TZ114 nachgewiesen werden. Aminosäure-Sequenzen werden in Abb. 13 gezeigt.

	CDR3- Länge	Se- quenz	TCRDV3	N/D	DTDKLIFGKG	DJ1
					SWDTRQMYFGAG	DJ3
					HLPLTFGQG	DJ4
TZ57						
	09	8374-3	LADSARYFCAFW		SWDTRQMYFGAG	DJ3
	09	8374-2	LADSARYFCAFW	Y	WDTRQMYFGAG	DJ3
	09	8403-2	LADSARYFCAFW	RYH	DTDKLIFGAG	DJ1
	09	8401-10	LADSARYFCAFW	E	SWDTRQMYFGAG	DJ3
	09	8404-2	LADSARYFCAFW	YSYVDV	LTFGQG	DJ4
TZ95						
	09	8374-3	LADSARYFCAFW		SWDTRQMYFGAG	DJ3
	09	8408-6	LADSARYFCAFW	YWRWEA	LTFGQG	DJ4
	09	8410-1	LADSARYFCAFW	RSYVDL	LTFGQG	DJ4
	09	8410-2	LADSARYFCAFW	GYR	DTDKLIFGKG	DJ1
	09	8410-3	LADSARYFCAFW	YYVD	LPLTFGQG	DJ4
	09	8374-2	LADSARYFCAFW	Y	WDTRQMYFGAG	DJ3
	09	8407-13	LADSARYFCAFW	YGG	DTDKLIFGKG	DJ1
	09	8407-4	LADSARYFCAFW	FLYD	LPLTFGQG	DJ4
	09	8407-7	LADSARYFCAFW	YDYVVG	LTFGQG	DJ4
	09	8407-8	LADSARYFCAFW	YSYVDT	LTFGQG	DJ4
	09	8407-10	LADSARYFCAFW	YS	SWDTRQMYFGAG	DJ3
	09	8406-3	LADSARYFCAFW	YVRGIQA	TFGQG	DJ4
	09	8406-6	LADSARYFCAFW	ELVWEVS	LTFGQG	DJ4
	09	8406-10	LADSARYFCAFW	EVGGIQA	LTFGQG	DJ4
	09	8406-2	LADSARYFCAFW	YVF	DTDKLIFGKG	DJ1
	09	8406-12	LADSARYFCAFW	YWDD	LPLTFGQG	DJ4
	09	8413-9	LADSARYFCAFW	GV	DTDKLIFGKG	DJ1
	09	8413-11	LADSARYFCAFW	VLRG	DTDKLIFGKG	DJ1
TZ114						
	09	8374-3	LADSARYFCAFW		SWDTRQMYFGAG	DJ3
	09	8507-1	LADSARYFCAFW	YE	DTDKLIFGKG	DJ1
	09	8507-4	LADSARYFCAFW	YDERY	KLIFGKG	DJ1
	09	8507-8	LADSARYFCAFW	GYSYR	DKLIFGKG	DJ1
	09	8507-9	LADSARYFCAFW	CTVGRGM	TFGQG	DJ4
	09	8511-3	LADSARYFCAFW	YSYVDVGT	LTFGKG	DJ4
	09	8511-1	LADSARYFCAFW	CWED	LPLTFGKG	DJ4
	09	8511-2	LADSARYFCAFW	YY	DTDKLIFGKG	DJ1
	09	8511-6	LADSARYFCAFW	HG	DTDKLIFGKG	DJ1
	09	8511-10	LADSARYFCAFW	ELRTGG	PLTFGKG	DJ4
	09	8513-1	LADSARYFCAFW	EWLV	HLPLTFGKG	DJ4
	09	8513-7	LADSARYFCAFW	ELGRY	LPLTFGKG	DJ4
	09	8513-4	LADSARYFCAFW	TLG	HLPLTFGKG	DJ4
	09	8513-9	LADSARYFCAFW	SYVDEY	LTFGKG	DJ4
	09	8513-10	LADSARYFCAFW	ERRY	LPLTFGKG	DJ4

Abbildung 13: Aminosäure-Sequenz von translatierten DV3 Transkripten, die in Abb. 12 gezeigt werden.

Das DV3 Repertoire des Thymus von TZ95-114 ist hochdivers und enthält nicht das invariable Transkript, das hingegen häufig in Darm und Milz auftritt

Um einerseits die Häufigkeit des invariablen DV3 Transkripts zu charakterisieren und andererseits andere DV3 Transkripte gleicher Länge zu identifizieren, klonierten und sequenzierten wir Banden unterschiedlicher Organe der Länge 9 von TZ57, TZ95 und TZ114 (Abb. 12).

Wie erwartet stießen wir bei TZ57 auf ein beinahe monoklonales DV3 Repertoire, wobei das invariable DV3 Transkript in allen untersuchten Organen dominierte (Sequenz 8374-3). Diese Daten bestätigten die Ergebnisse, die wir durch direkte Sequenzierung von dominanten DV3 Banden von TZ57 erhielten, bei der das invariable DV3 Transkript identifiziert wurde (Abb. 11).

Bei TZ95 und TZ114 wurde das invariable DV3 Transkript häufig in Ileum, Kolon und Milz gefunden; zudem identifizierten wir einige zusätzliche DV3 Transkripte gleicher Länge, die sich durch lange N/D Regionen auszeichneten. Interessanterweise waren wir nicht in der Lage, das invariable DV3 Transkript im Thymus von älteren Feten von TZ95 und TZ114 zu identifizieren. Dies legt die Vermutung nahe, daß es hier zu einer Kompartimentierung dieses invariablen DV3 Transkripts während der späten Tragzeit kommt.

Mittels retrospektiver Analysen postnataler Daten unserer Arbeitsgruppe (134) wurden weder das invariable DV3 Transkript noch die Präsenz einer dominanten Bande der Länge 9 nachgewiesen. Dennoch konnten wir mittels Sequenzierung einer DV3 Bande der Länge 9 aus einer Probe, die vom Kolon eines 2 Wochen alten Schwein stammte, jenes invariable Transkript identifizieren (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kommt man zu der Feststellung, daß das invariable Transkript innerhalb der DV3 Familie zuerst in Erscheinung tritt, daß es das DV3 Repertoire bei Tragzeitmitte dominiert und daß es gegen Ende der Tragzeit eine Kompartimentierung erfährt.

Weitere invariable DV3 Transkripte können in verschiedenen Feten nachgewiesen werden

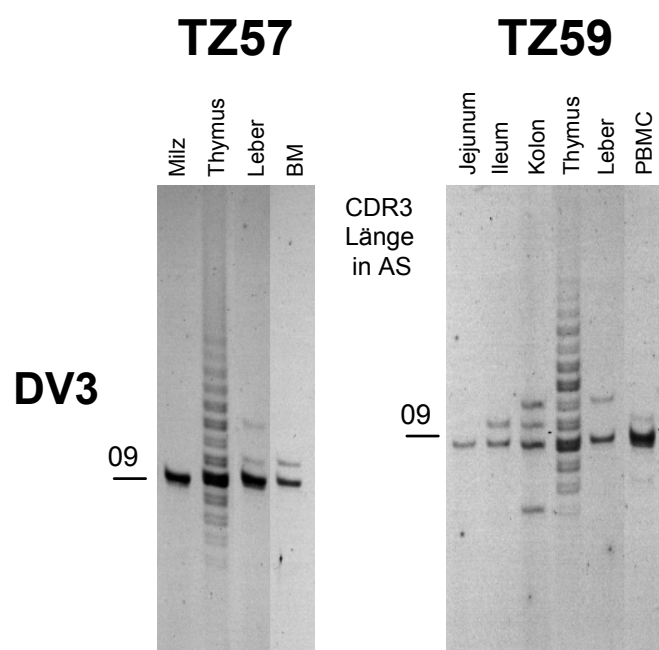
Wir konnten ein anderes DV3 Transkript mit einer Länge von 9 Aminosäuren ausfindig machen, daß zwischen verschiedenen Organen und Feten von TZ70/90 (Abb. 8, Sequenz 8374-2), TZ57 und TZ95 (Abb. 12) identisch war. Dieses Transkript unterschied sich nur durch ein Nukleotid von dem invariablen DV3 Transkript, wodurch die Generierung der Aminosäure Thyrosin [Y] statt Serin [S] hervorgerufen wurde (Abb. 13).

Einige andere Transkripte unterschieden sich auch nur durch eine Aminosäure, so daß es wahrscheinlich erscheint, daß noch andere gemeinsam genutzte Transkripte aufgedeckt werden könnten, wenn eine größere Anzahl Transkripte sequenziert werden würde. Dennoch dominierte keine dieser Sequenzen das Repertoire.

Interessanterweise konnten wir zwei DV3 Sequenzen bei TZ57 (Abb. 12, 8404-2) und TZ95 (8407-8) mit einer langen N/D Region identifizieren, die sich nur durch eine Aminosäure unterschieden („YSYVD“, Abb. 13). Beide gebrauchten nahezu die gesamte DD1 Region in Verbindung mit DJ4. Diese Anordnung wurde auch bei TZ114 gefunden (8511-3).

Das invariable DV3 Transkript wird nicht von PCR Artefakten hervorgerufen

Wir führten ein Kontroll-Experiment durch, um die Möglichkeit einer PCR Kontamination, die die Dominanz des invariablen DV3 Transkripts in verschiedenen Organen und Feten erklären könnte, auszuschließen. In diesem Versuch wurden dieselben Proben von Feten von TZ57 und TZ59 mittels dem Original DV3 Primer und einem neuen C δ Primer amplifiziert, der außerhalb der zuvor amplifizierten DV3 Transkripte bindet. Auf diese Weise konnten wir eine Amplifikation von zuvor amplifizierten PCR Produkten, die eventuell RNA oder PCR Reagentien hätten kontaminieren können, ausschließen. Das Ergebnis wird in Abbildung 14 gezeigt: ein fast identisches CDR3 Profil mit einer dominanten Bande bei Länge 9 (vergleiche mit Abb. 10a). Direktes Sequenzieren bestätigte das invariable DV3 Transkript. Zudem zeigt das DV3 Repertoire des Thymus von TZ57 und 59 stärkere Diversität als das anderer Organe.



Es existieren keine gemeinsamen DV4 Transkripte zwischen verschiedenen Feten

Die DV4 Profile von TZ57 und 59 (Abb. 10a) sowie TZ70 (Abb. 7) deuteten auf ein limitiertes Repertoire hin, zudem waren dominante Banden sichtbar. Tatsächlich waren wir auch in der Lage, prominente Banden mit den Längen 9 und 12 von Jejunum und Kolon des Feten von TZ59 direkt zu sequenzieren (Abb. 10a). Dennoch wurden unterschiedliche Transkripte bei gleicher Aminosäurenlänge in beiden Geweben gefunden (Abb. 11).

Weiterhin ließen sich mittels Klonierung und Sequenzierung keine gemeinsamen DV4 Transkripte in der Milz von TZ70 und TZ90 ausmachen (siehe Abb. 7 und 8).

Dies läßt den Schluss zu, daß die Präsenz von prominenten DV4 Banden oder von repetitiven DV4 Transkripten (Abb. 8) innerhalb einer Bande wahrscheinlich das Resultat einer Amplifikation einer sehr kleinen Zahl an TCR δ Transkripten während der frühen Tragzeit darstellt und nicht etwa von klonal expandierten γ/δ Zellen hervorgerufen wird.

In gleicher Weise ist wahrscheinlich die geringe Anzahl der DV2 Transkripte der Grund für das, besonders bei jungen Schweinen, eingeschränkte DV2 Repertoire (Abb. 10). Wie zuvor erwähnt (134), hatten wir Schwierigkeiten, DV2 Transkripte von alten Schweinen (>2,5 Jahre) zu amplifizieren.

Verschiedene DV1 Familienmitglieder verwenden identische N/D Regionen

Um das stärker diverse DV1 Repertoire zu analysieren, klonierten und sequenzierten wir DV1 Banden mit einer Länge von 8 während der frühen (TZ57) und der späten Tragzeit (TZ95).

Die entsprechenden CDR3 Profile deuteten auf ein stark polyklonales Repertoire für beide Tragzeiten hin (Abb. 10). Dies wurde mittels Sequenzierung bestätigt, bei der wir im Gegensatz zum DV3 Repertoire auf ein diverses Repertoire ohne Überlappung identischer Transkripte zwischen zwei Feten stießen (Abb. 15).

Dennoch beobachteten wir einige DV1 Transkripte, die identische N/D Regionen benutzten, aber andere DV1 Familienmitglieder. Entweder waren die N/D Regionen sehr kurz oder nicht vorhanden. In dieser Hinsicht ähnelten sie dem invariablen DV3 Transkript (Abb. 15 und 16).

Es ist höchstwahrscheinlich, daß identische kurze DV1 Transkripte in verschiedenen Feten vorhanden wären, wenn eine größere Anzahl Transkripten sequenziert würden. Dennoch konnte kein dominantes und invariables DV1 Transkript, wie es für das DV3 Repertoire der Fall war, ausfindig gemacht werden.

Abbildung 15: Junktionale Sequenzen von DV1 Transkripten von Feten der TZ57 und 95. Diese erhielt man durch Klonierung und Sequenzierung einzelner Banden einer CDR3 Länge von 8 (Abb. 10). Eine Überlappung identischer Sequenzen zweier Feten existierte nicht. Siehe Legende der Abb. 8. Die Sequenzen 8394-4 und 8393-1 waren außerhalb des Leseramens. Aminosäure-Sequenzen und die Bezeichnung der unterschiedlichen DV1 Familienmitglieder werden in Abb. 16 gezeigt.

	CDR3- Länge	Se- quenz	DV1 Familie	TCRDV1	N/D	DTDKLIFGKG	DJ1
						SWDTRQMYFGAG	DJ3
						HLPLTFGQG	DJ4
TZ57							
	08	8390-9	1.11C	QPEDSAKYFCALR	A	WDTRQMYFGAG	DJ3
	08	8390-2	1.11C	QPEDSAKYFCALW		SWDTRQMYFGAG	DJ3
	08	8390-1	1.2/3	QMKDSATYFCALW	DSYGLV	LTFGQG	DJ4
	08	8390-3	1.11B	QLDDSATYFCALR	EEVS	LPLTFGQG	DJ4
	08	8390-5	1.11	QLED SATYFCALR	EYRYV	PLTFGQG	DJ4
	08	8390-8	1.2/3	QMKDSATYFCALW	EL	DTDKLIFGKG	DJ1
	08	8390-10	1.11C	QPEDSATYFCALR	ELRGG	PLTFGKG	DJ4
	08	8389-1	1.11C	QPEDSAKYFCALR	GY	DTDKLIFGKG	DJ1
	08	8389-3	1.2/3	QMKDSATYFCALW	DVS	HLPLTFGQG	DJ4
	08	8389-5	1.8/10	QPQDSAKYFCALR	QRG	HLPLTFGQG	DJ4
	08	8389-9	1.4	QLQDSATYFCALW		SWDTRQMYFGAG	DJ3
	08	8389-4	1.11C	QPEDSAKYFCALR		SWDTRQMYFGAG	DJ3
	08	8388-5	1.11C	QPEDSAKYFCALR	VF	DTDKLIFGKG	DJ1
	08	8388-11	1.11C	QPEDSAKYFCALR	ELR	TDKLIFGKG	DJ1
	08	8388-2	1.11	QLED SATYFCALR	VY	DTDKLIFGKG	DJ1
	08	8388-13	1.2/3	QMKDSATYFCAL	LVY	DTDKLIFGKG	DJ1
	08	8388-1	1.8/10	QPEDSATYFCALR	QLRGGGM	TFGQG	DJ4
	08	8388-15	1.11C	QPEDSAKYFCALR	D	WDTRQMYFGAG	DJ3
	08	8388-9	1.2/3	QMKDSATYFCALW	EY	DTDKLIFGKG	DJ1
	08	8391-5	1.9	QLQDSAKYFCALR	EY	DTDKLIFGKG	DJ1
	08	8391-7	1.2/3	QMKDSATYFCALW	ELA	TDKLIFGKG	DJ1
	08	8391-1	1.2/3	QMKDSATYFCALW	ED	DTDKLIFGKG	DJ1
	08	8391-6	1.5	QLNDSAMYFCALW	ED	DTDKLIFGKG	DJ1
TZ95							
	08	8395-1	1.4	QLQDSATYFCALW	D	WDTRQMYFGAG	DJ3
	08	8395-8	1.11	QLED SATYFCALR	D	WDTRQMYFGAG	DJ3
	08	8395-2	1.11C	QPEDSAKYFCALR	VY	DTDKLIFGKG	DJ1
	08	8395-9	1.11B	QLDDSATYFCALR	GYH	TDKLIFGKG	DJ1
	08	8395-7	1.4	QLQDSATYFCALR	GY	DTDKLIFGKG	DJ1
	08	8397-8	1.5	QLNDSAMYFCAL	LGATSI	PLTFGQG	DJ4
	08	8397-4	1.1	QMKDSATYFCALW	N	WDTRQMYFGAG	DJ3
	08	8397-7	1.2/3	QMKDSATYFCALW	D	WDTRQMYFGAG	DJ3
	08	8397-9	1.11	QLDDPATYFCALR	YD	DTDKLIFGKG	DJ1
	08	8397-6	1.11B	QLDDSATYFCALR	ATY	TDKLIFGKG	DJ1
	08	8394-1	1.11C	QPEDSAKYFCALR	GYTEV	PLTFGQG	DJ4
	08	8394-5	1.11C	QPEDSAKYFCALR		SWDTRQMYFGAG	DJ3
	08	8394-8	1.5	QLNDSAMYFCALW		SWDTRQMYFGAG	DJ3
	08	8394-3	1.11B	QLDDSATYFCA	KGGGIA	LPLTFGQG	DJ4
	08	8394-7	1.4	QLQDSATYFCALW	ERYRY	KLIFGKG	DJ1
	08	8394-9	1.11C	QPEDSAKYFCALR	ATWSGI	LTFGQG	DJ4
	08	8394-10	1.2/3	QMKDSATYFCALW	DGG	TDKLIFGKG	DJ1
	08	8393-2	1.11C	QPEDSAKYFCATW	LVGYR	PLTFGQG	DJ4
	08	8393-3	2/3	QMKDSATYFCALW	ELRGHA	LTFGQG	DJ4
	08	8393-7	1.4	QLQDSATYFCALW	ERGIRA	LTFGQG	DJ4
	08	8393-9	1.2/3	QMKDSATYFCALW	EGF	HLPLTFGQG	DJ4
	08	8392-8	1.11	QLED SATYFCALR	RG	DTDKLIFGQG	DJ1
	08	8392-1	1.11	QLED SATYFCALR	GWVS	DKLIFGQG	DJ1
	08	8392-2	1.4	QLQDSATYFCALW	DRWDT	KLIFGQG	DJ1
	08	8392-4	1.11	QLED SATYFCALR	SK	DTDKLIFGQG	DJ1

Abbildung 16: Aminosäure-Sequenzen von übersetzten DV1 Transkripten, die aus Abb. 15 stammen. Die dritte Säule zeigt an, welche DV1 Familie verwendet wurde.

4.2 Molekularbiologische Besonderheiten der fetalen $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Transkripte

Die durchschnittliche CDR3 Länge der TCR δ Transkripte nimmt mit der Ontogenese hin zu

Eine weitere interessante Entdeckung war die Beobachtung, daß die durchschnittliche CDR3 Länge, ungeachtet der DV Familie, bei TZ70 viel kürzer war als zu einem späteren Zeitpunkt der Ontogenese (TZ90 oder TZ110) (Abb. 7).

Dennoch konnten N Nukleotid-Additionen und der Gebrauch von DD Gen-Segmenten bereits bei TZ38 und TZ57 (Abb. 11 und 12) beobachtet werden, was darauf hindeutet, daß TdT bei Schweinen bereits während der frühen Gestation aktiv ist.

Der Gebrauch der D- und J-Region von TCR δ Transkripten

Die komplette Länge der Germline DNA-Sequenzen für DD Regionen sind noch immer unbekannt; drei DD Regionen wurden, basierend auf deren Anordnung, abgeschätzt (134; 145). Zudem identifizierten wir eine mögliche vierte DD Region (GGAGGTATCG), die 13 mal benutzt wurde (Voraussetzung war eine Übereinstimmung von mindestens 6 Nukleotiden; Abb. 8,11,12,15).

P Nukleotide (105) wurden nicht zugeordnet, da die vollständige Länge der Nukleotidsequenzen für die V und D Regionen unbekannt ist.

Der Gebrauch der J-Region von fetalen TCR δ Transkripten ist von dem von postnatalen TCR δ Transkripten verschieden. Während die DJ3-Region nur von 4% der postnatalen TCR δ Transkripten gebraucht wurde (134; 145), wurde diese, wie in dieser Arbeit beschrieben, von 22% der fetalen TCR δ Transkripte genutzt (Doppeltes Vorkommen wurde nur einfach gezählt). DJ1 stellt die häufigst gebrauchte J-Region während der prä- und postnatalen Entwicklung dar.

Die Beobachtung, daß DJ2 während der prä- und postnatalen Entwicklung nicht detektiert wurde (134), gibt Hinweis darauf, daß DJ2 wahrscheinlich gar nicht gebraucht wird. Die Hypothese, daß DJ2 ein Pseudogen darstellt, wird durch die Beobachtung bekräftigt, daß der Abstand zwischen den Standard-Rekombination-Signalsequenzen nur eine Länge von 11 bp statt 12 bp aufweist (145; 146).

Weiterhin beobachteten wir, daß bei 46% (23 von 50) der DV1 Sequenzen eine negativ geladene Aminosäure Asparaginsäure [D] oder Glutaminsäure [E] mitten in der N/D Region platziert war, und zwar 4 Aminosäuren vom konservierten Cystein in Richtung 3' entfernt. Dies war bei 80 % (41 von 51) von DV3 der Fall. Nahe (3') dieser konservierten Aminosäure entdeckten wir bei 49 % (25 von 51) aller DV3 Transkripte die Aminosäure Tyrosin [Y]. Dies traf in schwächerem Maße für DV1 zu (10 von 50).

Die DV1 Familie besteht aus vielen Familienmitgliedern

DV Regionen werden in fünf Familien unterteilt, wobei das Einteilungskriterium in einer Nukleotid-Übereinstimmung von über 70% innerhalb der V-Regionen besteht (145). DV1 besteht mindestens aus 15 Mitgliedern, DV3 und DV5 aus je zwei, DV2 und DV4 wahrscheinlich aus je einem Gen.

Die DV1 Familienmitglieder wurden nicht zufällig gebraucht: DV1.11 und DV1.2/3 waren am häufigsten (Abb. 16). Wir waren nicht in der Lage, DV1.7, 1.13, 1.14 und 1.15 nachzuweisen.

In dieser Arbeit wurden zwei neue DV1 Familienmitglieder, die sich nur durch ein oder zwei Nukleotide von DV1.11 unterschieden, identifiziert. Wir bildeten provisorisch das Mitglied 1.11b: CTGGAIGATTCTGCTACGTACTTCTGTGCTCTCCGAG; und 1.11c: CCGGAAGATTCTGCTAAGTACTTCTGTGCTCTCCGAG). Da wir nur das 3' Ende aller TCRD Regionen amplifizierten, kennen wir nicht die 5' Sequenz des TCRD1 Gen-Segments.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß in der nahen Zukunft der gesamte TCR δ Locus sequenziert sein wird und die V-Regionen neu benannt werden. Beispielsweise bezeichnet eine kürzlich erschienene Veröffentlichung die DV5 Region als DV3 (146). Verschieden gebrauchte Nomenklaturen können leicht zu Verwirrungen führen.

4.3 Postnatale Entwicklung des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoires von keimfreien bzw. spezifisch-Pathogen-freien Schweinen

Dieser Teil der Experimente galt Untersuchungen zu einem möglichen Selektionsdruck auf das postnatale TCR δ Repertoire, ausgelöst durch Mikroorganismen. Hierbei dienten uns 10 Wochen alte Schweine als Versuchstiere, die unter keimfreien(GF)- bzw. spezifisch-Pathogen-freien(SPF) Bedingungen aufgezogen wurden; sogenannte GF- bzw. SPF-Schweine. Das mukosale Immunsystem der spezifisch-Pathogen-freien Schweine (SPF) ist vergleichbar mit jenem von konventionell gehaltenen Schweinen, außer daß deren Darmflora frei von pathogenen Keimen ist.

4.3.1 Das $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoire von 10 Wochen alten spezifisch-Pathogen-freien (SPF) Schweinen

Es wurde das TCR δ Repertoire von Dünndarm, Kolon, mesenterialen Lymphknoten, Milz und Thymus von 10 Wochen alten, spezifisch-Pathogen-freien Schweinen (SPF 1 und 2) untersucht (Abb. 17a).

Die CDR3 Profile der DV1, DV4 und DV5 Transkripte zeigten diversen Charakter. Dennoch waren inmitten des DV3 Repertoires einige klonale Expansionen auf polyklonalem Hintergrund sichtbar.

Zudem konnten dominante DV2 Banden identischer Länge (Länge von 17) in Jejunum und in Peyer'schen Plaques des Ileums bei Schwein SPF 1 entdeckt werden. Sequenzanalysen bestätigten die Gleichheit dieser DV2 Transkripte der beiden Gewebe (Sequenz 8531, Abb.18). Die CDR3 Profile der mesenterialen Lymphknoten, der Milz und des Thymus waren stark polyklonal.

4.3.2 Das $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoire von 10 Wochen alten keimfreien (GF) Schweinen

Das TCR δ Repertoire von 10 Wochen alten keimfreien Schweinen (GF) unterscheidet sich nicht signifikant von dem spezifisch-Pathogen-freier Schweine (SPF)

Untersucht wurde das TCR δ Repertoire von 10 Wochen alten keimfreien Schweinen (GF 1 und 2) (Abb. 17b). Folgende Organe standen uns zur Verfügung: Dünndarm, Kolon, mesenteriale Lymphknoten, Milz und Thymus.

In ähnlicher Weise wie bereits bei den 10 Wochen alten SPF Schweinen (Abb. 17a) beobachtet, waren auch hier klonale Expansionen inmitten der intestinalen DV2 Population, in schwächerem Maße auch in der DV3 Population, sichtbar. Die CDR3 Profile der mesenterialen Lymphknoten, der Milz und des Thymus wiesen starke Diversität auf.

Sequenzanalysen bewiesen, daß es sich bei den DV2 Transkripten aus Jejunum, Peyer'sche Plaques des Ileums und Caecum von dem 10 Wochen alten Schwein GF 1 der Länge 14 (Sequenz 8535, Abb. 18) um die identische Sequenz handelte. Im Gegensatz dazu wiesen die dominanten Banden von DV2 Transkripten des 10 Wochen alten Schweins GF 2 mit einer Länge von 23 (Sequenz 8539, 8541) oder 17 (Sequenz 8543, 8547) unterschiedliche Sequenzen auf.

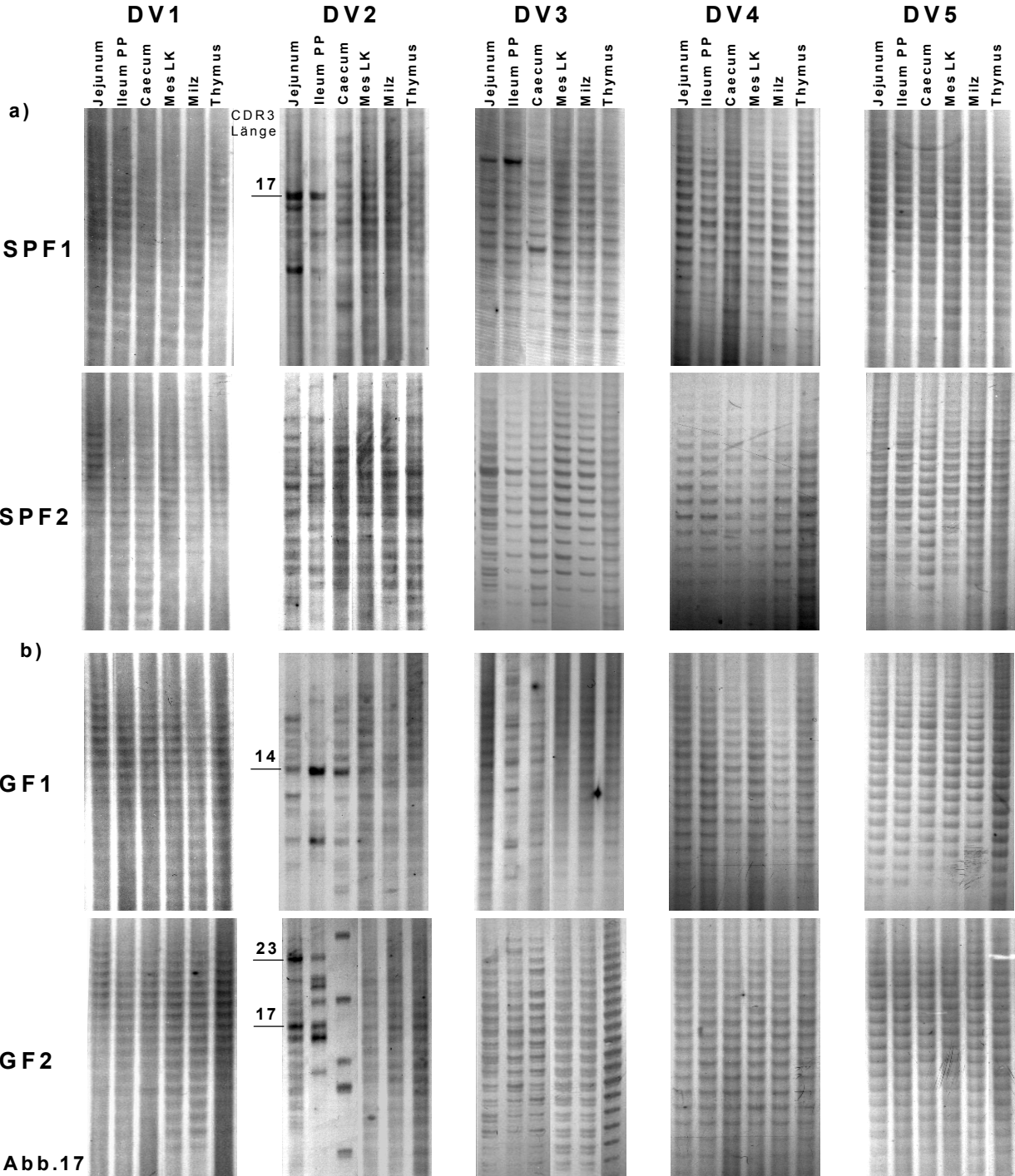


Abbildung 17: CDR3 Längenanalyse von TCR δ Transkripten von 10 Wochen alten SPF und GF Schweinen.

a) Von Schwein SPF 1 und 2 abstammend; PCR-amplifizierte DV1-DV5 Transkripte von Jejunum, Peyer'schen Plaques des Ileum, Caecum, mesenterialen Lymphknoten, Milz und Thymus wurden auf demselben Gel gegeneinander aufgetrennt. Der Abbildung ist ein stark polyklonales CDR3 Profil der DV1, DV4 und DV5 Transkripte zu entnehmen, wohingegen Transkripte von DV2 und DV3 aus Jejunum und Peyer'schen Plaques des Ileum multiple klonale Expansionen aufwiesen. Die direkte Sequenzierung von zwei dominanten DV2 Banden mit einer CDR3 Länge von 17 (Schwein SPF 1) ermittelten dieselbe Sequenz (Abb. 18).

b) Von Schweinen GF 1 und 2 abstammend; DV1-DV5 Transkripte wurden wie oben beschrieben analysiert. In ähnlicher Weise waren wie bei Schweinen SPF 1 und 2 klonale Expansionen im intestinalen DV2 Repertoire sichtbar, in geringerer Ausprägung auch bei DV3. Dominante Banden, mit der entsprechenden CDR3 Länge am Rand des Gels versehen, wurden ausgeschnitten, reamplifiziert und direkt sequenziert (Abb. 18).

CDR3 -		Se-	TCRDV	DD1		DD2		DD3		GACGAGAGGATGATACAGAT DJ1	
Länge	quenz	N		ACAGCTACGTGGAC	N	GGGGTTGGTAC	N	GGTGGGATACA	N	CATCTTCCACTGACATTCGG DJ4	
DV2											
SPF1	17	8531	TTTCTGCGCTTACAGTG	AACCCCTGG	TACG			TGGGATA	TACGAGATTATCA	GATACAGAT DJ1	
GF1	14	8535	TTTCTGCGCTTACAG	CCTC		TGGTAC	AGCGGTAC	GGTGGGATACA	G	AGAT DJ1	
GF2	23	8539	TTTCTGCGCTTA	TAGTG	AGCTACG	TGGACG	GGGGT	GGTGGGATACA	CGAGATCGGTATC	GATGATACAGAT DJ1	
GF2	23	8541	TTTCTGCGCTTACAGTG	T	ACAGCTA	AAGGGGTACA	GTTGGTAC	TGGGAT	CCTATACGAGG	GAGGATGATACAGAT DJ1	
GF2	17	8543	TTTCTGCGCT	CTAT	ACAGCTACGT	CAGCTG	GGGGG		AACACGGCAGATCGG	TACAGAT DJ1	
GF2	17	8547	TTTCTGCGCTTAC	CAGCCGGCGTACAGG	TACGTGG	TAAGCGGAA	GGT			ATGATACAGAT DJ1	

Abbildung 18: Junktionale Sequenen von TCR δ Transkripten von GF bzw. SPF Schweinen. Diese erhielt man durch direktes Sequenzieren dominanter Banden aus Abbildung 17 a,b. Mutmaßliche DD und DJ Genomsequenzen sind zu oberst fett gedruckt (siehe Text).

5. Diskussion

5.1 Pränatale Entwicklung $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor Repertoires des Schweins

Erstmalig wird mit dieser Arbeit die Ontogenese des pränatalen $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor Repertoires des Schweins beschrieben.

Die zentrale Entdeckung dieser Arbeit stellt das invariable DV3 Transkript dar, das in allen Feten während der frühen Gestation (38. Tag der Tragzeit, TZ38) bis hin zur Geburt (TZ114) vorhanden war.

5.1.1 Charakteristika der invariablen DV3 Kette des fetalen Schweins

Man bezeichnet ein Transkript als invariabel, wenn dieses an seiner Verknüpfungsstelle, auch CDR3 Region genannt, keine Diversität aufweist. Die Verknüpfungsstelle eines Transkripts stellt jenen Ort dar, an dem jeweils ein V (variabel)-Gen-Segment mit je einem J (Joining)-Gen-Segment und dem C (konstant)-Gen-Segment verbunden wird (siehe 1.3.3).

Die Vielfalt der Verbindungsregion bei δ Transkripten wird zum einen durch die Verknüpfung zusätzlich verfügbarer D (Diversity)-Gen-Segmente erhöht und zum anderen durch eine in diesem Bereich stattfindende Addition bzw. Deletion matrizenunabhängiger Nukleotide (N-Region). Auch das Anheften palindromischer Mono- oder Dinukleotide (P-Nukleotide) ist möglich. Auf diese Art und Weise wird die Vielfältigkeit der Verbindungsregion erhöht, das heißt sogenannte junktionale Diversität geschaffen. Anzumerken ist, daß das Hinzufügen von N-Nukleotiden nur durch ein aktives Enzym, der sogenannten terminalen Desoxynukleotidyltransferase (TdT), bewerkstelligt wird. Der Rezeptorabschnitt, der die D- und N-Regionen beinhaltet und somit die größte Diversität aufweist, wird auch als CDR3 Domäne bezeichnet. Sie bestimmt die Spezifität des Rezeptors. Demnach zeichnet sich ein invariables Transkript durch eine sehr eingeschränkte Vielfalt in der Verknüpfungsstelle aus.

Bei dem in dieser Arbeit beschriebenen invariablen DV3 Transkript ist das DV3-Gen-Segment direkt, d. h. ohne D-Region oder N-Nukleotide, mit einem DJ3-Gen-Segment verbunden.

Dieses invariable DV3 Transkript dominierte während der Gestationsmitte, etwa um den 55. Tag der Tragzeit (TZ55), alle analysierten Organe. Gegen Ende der Gestation, also etwa vom 90. Tag (TZ90) bis zum 114. Tag der Tragzeit (TZ114), verlor dieses Transkript an Dominanz. Gleichzeitig wurde es aber noch häufig in peripheren Organen wie dem Intestinum und der Milz gefunden. Im Thymus hingegen konnte es zu dieser Zeit nicht mehr nachgewiesen werden. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß die invariable DV3 Kette gegen Ende der Gestation im Thymus nicht mehr länger rearrangiert wird, wohingegen $\gamma\delta$ T-Zellen, die diese invariable Kette tragen, in der Peripherie „überleben“.

Es wurde neben dem invariablen DV3 Transkript kein anderes invariables TCR δ Transkript identifiziert, welches in verschiedenen Feten präsent gewesen wäre. Dies führt zur Annahme, daß den $\gamma\delta$ T-Zellen, die diesen DV3 Rezeptor exprimieren, eine einzigartige Rolle zukommt.

Invariable TCR δ Ketten wurden bereits bei Mäusen beschrieben (107; 156-159). Es konnte demonstriert werden, daß während der fetalen Entwicklung $\gamma\delta$ Thymozyten periphere Organe wie die Haut, den Darm und den Reproduktionstrakt in verschiedenen Wellen kolonisieren. Diese Wellen werden von $\gamma\delta$ T-Zell-Populationen hervorgerufen, die entwicklungsabhängig jeweils bestimmte V_γ und V_δ Gen-Segmente exprimieren; bis zur Geburt sind dies interessanterweise nur zwei verschiedene V_γ Ketten und immer dieselbe V_δ Kette. Charakteristisch bei der wellenartigen Entwicklung ist, daß zum einen die jeweils exprimierten Ketten invariabel sind, das heißt ihre Verknüpfungsstelle (siehe oben) weist eingeschränkte Variabilität auf und daß zum anderen die meisten $\gamma\delta$ T-Zellen einer Welle die gleichen invariablen Ketten exprimieren und damit über die gleiche Spezifität verfügen. Welches Antigen dieser $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor bindet, ist noch ungeklärt (160-163).

Bei Schweinen sind wir, im Gegensatz zu Mäusen und Menschen, weder in der Lage, die Häufigkeit der $\gamma\delta$ T-Zellen, die die DV3 Kette exprimieren,

herauszufinden, noch zu überprüfen, ob oben beschriebene entwicklungsabhängige Wellen während der fetalen Entwicklung existieren. Der Grund dafür liegt darin, daß beim Schwein keine, gegen V Regionen gerichtete Antikörper verfügbar sind.

5.1.2 Die Rolle des Enzyms TdT bei der fetalen Entwicklung des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoires verschiedener Spezies

Die Rolle des Enzyms TdT bei der fetalen Entwicklung des TCR δ Repertoires des Schweins im Vergleich zu jener des Menschen und der Maus

Das TCR δ Repertoire des Schweins unterscheidet sich erheblich von dem der Maus. Bei der Maus weist das TCR δ Repertoire bei Geburt keine funktionale Diversität auf und N Nukleotid Additionen erscheinen nicht vor dem 3. bis 5. postnatalen Tag. Der Grund dafür liegt darin, daß das oben erwähnte Enzym TdT erst ab dem 3. bis 5. postnatalen Tag expremiert wird (117). Demnach verfügt keine der TCR δ Ketten bei der Maus vor der Geburt über funktionale Diversität.

In dieser Hinsicht weist die Entwicklung des TCR δ Repertoires beim Schwein mehr Ähnlichkeiten mit dem des Menschen auf (113), da TdT in beiden Spezies (164) vor der Geburt schon in aktiver Form vorliegt. Hinweis darauf erhielten wir beim Betrachten der Sequenzen des Schweins während der frühen Fetalzeit. Die TCR δ Transkripte des Schweinefeten wiesen bereits am 38. Tag der Tragzeit (TZ38) komplexe funktionale Regionen auf. Dennoch konnten wir beim Vergleich der einzelnen CDR3 Längen der δ Transkripte eine entwicklungsabhängige Veränderung entdecken: die durchschnittliche CDR3 Länge während der Mitte der Gestation (vor TZ70) war viel kürzer als am Ende der Gestation (etwa um TZ110). Dies deutet darauf hin, daß die Aktivität des Enzyms TdT mit dem Fortschreiten der Fetalzeit zunimmt und demnach die Entstehung der TCR δ Transkripte einer entwicklungsabhängigen Dynamik unterliegt.

Diese beim Schwein gemachte Beobachtung geht konform mit jener, die man bei Menschen gemacht hatte (113); sie steht allerdings im Kontrast zu Studien über das fetale Antikörper Repertoire bei Schweinen. Hierbei wurden junge Feten (30 Tage alt) und ältere Feten (gegen Ende der Tragzeit) hinsichtlich ihrer Transkripte für die schwere Kette der Antikörper (IgH) verglichen: die CDR3 Längen der jeweiligen Transkripte wiesen keine Unterschiede auf. Daraus folgerte man, daß das Enzym TdT hinsichtlich der Entstehung der schweren Antikörper-Ketten bereits zu dem frühesten Zeitpunkt, an dem die VDJ-Gen-Rekombination stattfindet, volle Aktivität besitzt (164). Aus diesen Beobachtungen läßt sich folgern, daß wahrscheinlich bei $\gamma\delta$ T-Zellen im Vergleich zu Antikörper produzierenden B-Zellen die Addition von N/D Regionen und damit die Schaffung von langen CDR3 Regionen auf unterschiedliche Art reguliert wird. Möglicherweise ist dieses abhängig vom Ort der Rekombination: B-Zellen reifen im Knochenmark, während sich T-Zellen im Thymus entwickeln.

5.1.3 Die Bedeutung der invariablen DV3 Kette des Schweins

Wir machten die Beobachtung, daß der Schweinefetus in der Lage ist, komplexere CDR3 Regionen als die Maus zu generieren, die nicht über eine aktive TdT verfügt. Es stellen sich uns folgende Fragen: 1) Wieso dominiert bei Gestationsmitte in allen Organen ein invariables DV3 Transkript, das sich durch das Fehlen der kompletten N und D Region auszeichnet, wobei der Schweinefetus doch, wie oben dargelegt, im Stande ist, komplexe funktionale Regionen zu schaffen? 2) Wieso zeigt dieses invariable Transkript gegen Ende der Gestation und auch noch zwei Wochen nach Geburt ein gehäuftes Vorkommen? Was hält seine Existenz aufrecht?

Trotz dieser bisher noch unbeantworteten Fragen, sind die Indizien dafür, daß diese fetalen $\gamma\delta$ T-Zellen eine wichtige Funktion während der fetalen Entwicklung und in der frühen postnatalen Periode innezuhaben scheinen, nicht von der Hand zu weisen. Würden diese fetalen $\gamma\delta$ T-Zellen keine bedeutenden Rolle spielen, wären sie nach der Geburt nicht mehr nachweisbar.

Obwohl in vorherigen Arbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen bereits identische invariable TCR δ Transkripte bei verschiedenen menschlichen Feten und in der frühen postnatalen Periode identifiziert werden konnten (103; 113), wurde nie solch eine Dominanz eines einzelnen TCR δ Transkripts beobachtet. Somit unterscheidet sich in diesem Punkt das Repertoire des Schweins von dem des Menschen.

Für das Verständnis der Funktionen der $\gamma\delta$ T-Zellen und damit für die Beantwortung der oben gestellten Fragen, ist es von enormer Wichtigkeit, den Ursprung der invariable TCR δ Kette zu ergründen und das Antigen zu definieren, das von $\gamma\delta$ T-Zellen, die diese invarianten Ketten exprimieren, erkannt wird.

5.1.4 Mögliche Mechanismen bei der Entstehung der invariablen DV3 Kette

Wie bereits in der Einleitung dargelegt, vermutet man, daß die Generierung des $\gamma\delta$ T-Zell-Repertoires während der Pränatalperiode beim Menschen nach einem strikt entwicklungsabhängigen Programm ablaufen könnte, deren Schrittmacher allerdings noch nicht identifiziert worden sind.

Dies scheint auch für die Generierung des Antikörper Repertoires von B-Zellen zuzutreffen. Bei menschlichen Feten konnte demonstriert werden, daß die Reifung des Repertoires nicht dadurch beschleunigt werden konnte, daß der Foetus externem Antigen in Form von Bakterien ausgesetzt wurde (165).

Es werden mehrere Mechanismen diskutiert, die bei dem strikt entwicklungsabhängigen Generierungs-Programm von Bedeutung sein könnten (siehe 1.4). Vorprogrammiertes Gen-Rearrangement wird zum Teil für das Erscheinen von invariablen Ketten bei Menschen und Mäusen verantwortlich gemacht (101; 148; 163). Wir stellen uns demnach die Frage, welche der möglichen Mechanismen das invariable DV3 Transkript beim fetalen Schwein zu generieren und kontrollieren vermögen. Ist es das Ergebnis einer Selektion

durch fetale Antigene, die zu bestimmten Tragzeiten expremiert werden oder stellt es das Resultat von vorprogrammiertem Gen-Rearrangement dar (148)?

Das invariable DV3 Transkript stellt möglicherweise das Resultat eines programmierten Gen-Rearrangements dar

Im Fall des in dieser Arbeit beschriebenen invariablen DV3 Transkripts wäre ein vorprogrammiertes Gen-Rearrangement wahrscheinlich, da kein anderes TCR δ Transkript identifiziert werden konnte, das in verschiedenen Organen dominant gewesen wäre. Ein zufälliges Gen-Arrangement invariabler Ketten hätte zusätzliche Banden unterschiedlicher CDR3 Länge hervorgerufen, da die vollständigen Längen der einzelnen DJ (Joining)-Regionen sich voneinander unterscheiden.

Ein weiterer möglicher Mechanismus des vermuteten, strikt entwicklungsabhängigen Programms zur Generierung des pränatalen TCR δ Repertoires stellt die Homologie-gesteuerte Gen-Rekombination dar. Diese Art der Rekombination vermutet man bei Entstehung des fetalen Repertoires beim Menschen. In vorangehenden Arbeiten wurden identische intestinalen TCR δ Transkripte zwischen verschiedenen humanen Feten gefunden, die bestimmte Charakteristika zeigten: eingeschränkte Variabilität der Verknüpfungsstelle (siehe oben) durch das Fehlen von N Nukleotid Additionen neben dem Vorhandensein vieler gestutzter Enden der Genomsequenzen und/oder P Nukleotid Additionen (113). Des weiteren verfügten sie über kurze, partiell homologe DNA-Abschnitte. Man nimmt an, daß jene Sequenzhomologien einen entscheidenden Einfluß auf die Rekombination der DV-, DD- und DJ-Segmente nehmen, wie es bereits für schwere Antikörperketten (IgH) und $\gamma\delta$ TCR-Transkripte von Mäusen vermutet wurde. Das entsprechende Modell sieht vor, daß Rearrangements zwischen den Exons der Rezeptor-Untereinheiten kodierender Gen-Segmente bevorzugt innerhalb partieller DNA-Sequenzüberlappungen stattfinden (148; 166-168). Leider konnten wir nicht feststellen, in welchem Ausmaß die Sequenzhomologie-

gesteuerte Gen-Rekombination zur Generierung des TCR δ Repertoires bei fetalen Schweinen beiträgt, da nur die kompletten Genomsequenzen für die DJ- und DC-Regionen bekannt sind (146), nicht aber für die DV- und DD-Regionen.

Die Rolle der Antigen-Selektion bei der Entstehung und Aufrechterhaltung des invariablen DV3 Transkripts

Hinsichtlich des fetalen TCR δ Repertoires des Menschen stellt man sich die Frage, in welchem Ausmaß die zuvor dargestellten Mechanismen der gerichteten Rekombinationsereignisse oder eine Antigen-Selektion in utero Einfluß auf den Umfang des fetalen TCR δ Repertoires nehmen.

Auch für das in dieser Arbeit beschriebene Auftreten der invariablen DV3 Kette beim Schwein scheint beides verantwortlich zu sein: zum einen die sich bei der Generierung von TCR δ Rezeptor-Ketten auswirkenden Einschränkungen, die von der fetalen Entwicklung bedingt werden. Damit sind die oben beschriebenen gerichteten Rekombinationsereignisse gemeint, die nach einem bestimmten Programm ablaufen, das heißt abhängig von einem bestimmten Reifegrad sind. Zum anderen scheint Selektionsdruck beim Auftreten der invariablen DV3 Kette eine gewisse Rolle zu spielen (158).

Für einen stattfindenden Selektionsprozeß spricht die Beobachtung, daß die invariable DV3 Kette beim Schweinefetus auch gegen Gestationsende sowie in der frühen Periode nach der Geburt vorhanden war; ein Zeitpunkt, an dem das fetale bzw. postnatale Schwein bereits im Stande ist, ein TCR δ Repertoire zu generieren, das über Diversität verfügt. Wie könnte man anders als durch Selektionsprozesse das Fortbestehen eines invariablen Transkripts inmitten von diversen Transkripten erklären?

Weitere Hinweise für eine stattfindende Selektion durch Antigen beim fetalen Schwein erlangen wir beim Betrachten der Aminosäure-Sequenzen der CDR3 Regionen der fetalen TCR δ Transkripte. Zum einen kodierten 80% der DV3-Transkripte und fast 50% der DV1-Transkripte in einer bestimmten Position innerhalb der N/D Region für negativ geladenen Aminosäuren. Zum anderen spricht auch die Entdeckung, daß einige Transkripte sich nur durch eine

kodierte Aminosäure unterschieden, dafür, daß eine Selektion durch ein bestimmtes Antigen stattgefunden haben könnte. Im Vergleich dazu konnte man bei TCR δ Transkripten von humanen Feten (der Leber) hochkonservierte Gen-Segment-Übergänge identifizieren, die jeweils hydrophobe, nicht durch die Keimbahn kodierte Aminosäuren determinieren (113; 169).

Diskutierte Antigene, die eine Selektion bestimmter $\gamma\delta$ T-Zellen bewirken

In Bezug auf den vermuteten Selektionsdruck, der auf $\gamma\delta$ T-Zellen ausgeübt wird und der in der Folge das Auftreten von $\gamma\delta$ T-Zellen mit bestimmten Rezeptoren, unter anderem die invariable DV3 Kette, bewirkt, werden mögliche Antigene diskutiert. Man hat bereits hinsichtlich der $\gamma\delta$ T-Zellen von Menschen und Mäusen die Hypothese aufgestellt, daß $\gamma\delta$ T-Zellen Selbstantigene erkennen könnten, die durch Streß induziert werden (53; 170; 171). Allerdings können wir die Frage nicht beantworten, ob fetale $\gamma\delta$ T-Zellen, die invariable Ketten exprimieren, dieselben Antigene erkennen, wie dies postnatale $\gamma\delta$ T-Zellen tun.

5.1.5 Die invariable DV3 Kette als mögliche primitive Form der immunologischen Erkennung

Nachdem wir nun die möglichen Mechanismen bei der Entstehung des fetalen TCR δ Repertoires mit seiner invariablen DV3 Kette erörtert haben, stellen wir uns die Frage, welche Funktionen die $\gamma\delta$ T-Zellen, die diese invariablen Kette exprimieren, während der fetalen Entwicklung und der frühen Postnatalperiode wahrnehmen. Sind diese $\gamma\delta$ T-Zellen im Organismus unabkömmlich? Wenn ja, aus welchem Grund?

Eine mögliche Antwort auf die Fragen könnte sein, daß invariable TCR δ Ketten während der fetalen Entwicklung eine primitive Form der immunologischen Erkennung darstellen, die während der Evolution konserviert wurde. Auf diese Art und Weise könnte dem Immunsystem die Fähigkeit verliehen werden, auf

wichtige Antigene zu reagieren, bevor sich das erworbene Immunsystem vollständig etabliert hat.

In 1.4.2 der Einleitung wurde bereits dargelegt, welche Funktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen des menschlichen Feten diskutiert werden. Auch ihnen wurden bereits wichtige Aufgaben bei der Immunantwort zugeschrieben, da man entdeckt hatte, daß $V\gamma 9/V\delta 2^+$ T-Zellen, die während der Fetalzeit des Menschen dominierten, die Fähigkeit haben, auf eine Vielfalt mikrobieller Pathogene wie z. B. Mykobakterien (99; 101) zu antworten und mütterliche Zellen (110) sowie Tumorzellen (111; 112) zu töten.

5.1.6 Vergleichende Analyse der invariablen Ketten vom Schwein, dem Menschen und der Maus

Die CDR3 Region der invariablen DV3 Kette des Schweins im Vergleich zu denen der invariablen Ketten beim Menschen und der Maus

Die in dieser Arbeit beschriebene invariable DV3 Kette beim Schwein weist wenig Gemeinsamkeiten mit den invariablen Ketten auf, die bereits beim Menschen und bei der Maus entdeckt wurden. Ein Beispiel hierfür erlangt man bei der Betrachtung der junktionalen Region (CDR3 Region): im Gegensatz zu den invariablen TCR δ Ketten des Menschen und der Maus wird bei der invariablen Kette des Schweins inmitten der junktionalen Region auf den Gebrauch von DD-Gen-Segmenten verzichtet. Beim Vergleich der CDR3 Längen hat sich herausgestellt, daß die invariable TCRDV5-DD2-DJ1 Kette, die in der Lunge von Mäusen beschrieben wurde (157; 159), und die invariable TCRDV1-DD2-DJ2 Kette, die in der Haut, dem Reproduktionstrakt und im fetalen Thymus von Mäusen dominiert (105; 160), jeweils eine CDR3 Länge von 12 Aminosäuren aufweisen, während die in dieser Arbeit beschriebene invariable DV3-DJ3 Kette des Schweins mit 9 Aminosäuren deutlich kürzer ist. Die geringere Länge könnte daraus resultieren, daß der junktionalen Region die DD Region fehlt.

Bei Menschen variiert die CDR3 Länge (9-12 Aminosäuren) der invariablen DV2 Ketten, die bei verschiedenen Feten entdeckt wurden, in Abhängigkeit zum

Gebrauch der DJ Region. Die Ursache dafür liegt darin, daß die einzelnen DJ-Regionen unterschiedliche Längen besitzen.

5.1.7 Die Rolle des Thymus bei der fetalen Entwicklung

Die Beobachtung, daß beim fetalen Schwein der Thymus im Vergleich zu intestinalen $\gamma\delta$ T-Zellen über ein stärker diverses TCR δ Repertoire verfügte und daß er gegen Ende der Gestation die invariable DV3 Kette nicht aufwies, ist vereinbar mit der Hypothese, dass ein kontinuierlicher Export von $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem Thymus stattfindet, die komplexe junktionale Regionen besitzen. Vermutlich wird auf diese Weise ein diverses TCR δ Repertoire in der Peripherie geschaffen.

Auch Vergleiche zwischen menschlichen DV2 Transkripten vom Thymus und Darm eines 15 Wochen alten Feten haben erbracht, daß das Repertoire des Thymus über Diversität verfügt, während das des Darms eingeschränkt war und mehrere Rezeptoren mehrfach angetroffen wurden (100; 103). Demzufolge kommt es während der frühen fetalen Entwicklung teilweise zu Überlappungen zwischen dem $\gamma\delta$ TCR Repertoire des Thymus und des Darms. In der zweiten Hälfte der Gestation hingegen etabliert sich die Individualität jedes einzelnen Repertoires, das nun keine Überlappungen mehr mit dem jeweils anderen aufzeigt. Invariable TCR δ Ketten werden im Thymus nur während der frühen Gestation generiert. Dies könnte das Zeitfenster sein, in dem invariable $\gamma\delta$ T-Zell-Populationen den Thymus verlassen und in verschiedene periphere Gewebe einwandern, wo sie sich ansiedeln und spezielle Funktionen wahrnehmen, wodurch sie am Leben erhalten werden (158).

Diese Vorstellung wird bekräftigt durch Daten über Feten des Schafs. Diese belegen, daß $\gamma\delta$ T-Zellen länger leben können und während der Fetalzeit rezirkulieren (149).

5.2 Untersuchung zum Einfluß durch Mikroorganismen auf das postnatale $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoire anhand keimfreier bzw. spezifisch-Pathogen-freier Schweine

In dem vorhergehenden Kapitel über die pränatale Entwicklung des TCR δ Repertoires wurde bereits der Selektion durch Antigene bei der Generierung des Repertoires starke Bedeutung beigemessen. Wie bereits beschrieben, wird vermutet, daß Eigenantigene für jene Selektion verantwortlich sein könnten.

Aus zuvor erhobenen Daten über Menschen (20; 22; 47; 113) und kürzlichen Publikationen über Affen (172; 173) stellt sich ein generelles Muster heraus, nach dem in jedem Organ unterschiedliche Antigene für die Selektion und Aufrechterhaltung des mukosalen TCR δ Repertoire verantwortlich zu sein scheinen. Die Antigene konnten bisher nicht definiert werden.

Mit der Absicht, die Frage zu klären, ob Fremdartigene, wie z. B. die Mikroorganismen der Darmflora, oder Eigenantigene (siehe 1.2.1), die klonale Expansion von $\gamma\delta$ T Zellen in der postnatalen Periode hervorrufen, untersuchten wir das TCR δ Repertoire von keimfreien (GF) bzw. spezifisch-Pathogen-freien (SPF) Schweinen. Um die Einflußnahme von mikrobiellen Faktoren beurteilen zu können, verglichen wir die Daten von diesen Versuchstieren mit den bereits erhobenen Daten von konventionell gehaltenen Schweinen.

Das TCR δ Repertoire von konventionell aufgezogenen Schweinen

In Versuchen mit konventionellen Schweinen (134) konnte demonstriert werden, daß das diverse TCR δ Repertoire des jungen Schweins, ähnlich dem des Menschen (113), mit zunehmendem Alter eine Einschränkung sowie eine Kompartimentierung erfährt: die ersten klonalen Expansionen der $\gamma\delta$ T Zellen etablieren sich innerhalb der intestinalen DV2 Population in einem Alter von 2 und 10 Wochen. In einem Alter von 6 Monaten treten klonale Expansionen auch in anderen DV Familien, insbesondere bei DV3, auf. Im Gegensatz dazu, verbleibt das TCR δ Repertoire von extraintestinalen Geweben wie den mesenterialen Lymphknoten, der Milz und dem Thymus stark polyklonal.

Demzufolge stellt bei konventionellen Schweinen die Klonalität der $\gamma\delta$ T Zellen kein generelles Merkmal des gesamten Organismus dar, sondern steht, jedenfalls während der ersten 6 Monate, in Abhängigkeit zur exprimierten DV Familie. Bei alten konventionellen Schweinen (bis zu 5,5 Jahren) weist das TCR δ Repertoire, unabhängig von der exprimierten DV Familie, ein in hohem Maße oligoklonales Muster auf.

Das TCR δ Repertoire von keimfreien (GF) bzw. spezifisch-Pathogen-freien (SPF) Schweinen

Der Grund für die Vermutung, daß Fremdantigene der Darmflora den ausschlaggebenden Faktor für die postnatale Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen darstellen könnten, liegt in der Beobachtung, daß es bei konventionellen Schweinen während der ersten 6 Lebenswochen zu einem mehr als 10fachen Anstieg der mukosalen T Lymphozyten kommt (152; 153; 174). Wären Fremdantigene tatsächlich für die postnatale klonale Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen verantwortlich, würde man bei keimfreien Schweinen (GF) erwarten, daß sie ein polyklonales TCR δ Repertoire statt einem oligoklonalen Repertoire exprimieren.

Bei unseren Versuchen konnte diese Hypothese widerlegt werden, da das TCR δ Repertoire von 10 Wochen alten keimfreien (GF) bzw. spezifisch-Pathogen-freien (SPF) Schweinen gleichermaßen klonale Expansionen innerhalb der DV2 Familie aufwies wie es bereits für gleichaltrige, konventionell gehaltene Schweine beschrieben wurde. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit Untersuchungsergebnissen einer Studie, in der man beobachten konnte, daß die Lokalisation von $\gamma\delta$ T Zellen im Darmepithel von Mäusen unabhängig von der normalen mikrobiellen Kolonisation war (15).

Demnach sprechen unsere Daten dafür, daß Eigenantigene statt Fremdantigene einen entscheidenden Einfluß auf das TCR δ Repertoire haben. Da die anderen DV Familien (DV3 etc.) bei konventionellen Schweinen jedoch erst viel später, also mehr als 20 Wochen, klonale Expansionen aufweisen,

wäre es wünschenswert, ältere keimfreie Tiere zu untersuchen. Dann könnte man die Frage beantworten, ob auch bei diesen älteren keimfreien Tieren klonale Expansionen - wie bei DV2 - nachweisbar sind. Leider stellt dies ein Problem dar, da ältere GF Schweine aufgrund ihrer Größe nicht in den gewöhnlichen Inkubator passen.

6. Zusammenfassung

6.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache

Die Gruppe der T-Lymphozyten beinhaltet je nach Ausprägung des T-Zell-Rezeptors zwei Zell-Populationen, die der $\alpha\beta$ beziehungsweise der $\gamma\delta$ T-Zellen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit den $\gamma\delta$ T-Zellen, da sie eine außerordentlich interessante und wenig erforschte Zellgruppe darstellen. Die Beobachtung einer bevorzugten Anreicherung von $\gamma\delta$ T-Zellen auf mukosalen Oberflächen, die mit einer Vielzahl von Antigenen konfrontiert sind, hat zur Hypothese geführt, dass $\gamma\delta$ T-Zellen eine „erste Garde der Immunabwehr“ bilden. Des weiteren geben zahlreiche Studienergebnisse Hinweise darauf, dass $\gamma\delta$ T-Zellen an der Pathogenese vieler Krankheiten, wie z. B. den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, beteiligt sind. Als Mitglied des Immunsystems scheinen $\gamma\delta$ T-Zellen nicht nur Funktionen sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunabwehr wahrzunehmen, sondern auch eine Vermittlerrolle zwischen beidem zu spielen.

Mit der Intention, ein grosses Tiermodell zu etablieren, um anhand dessen die Beeinflussbarkeit der $\gamma\delta$ T Zellen durch die Alterung und durch mikrobielle Faktoren besser analysieren zu können, wurde in vorhergehenden Studien die postnatale Entwicklung des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor(TCR)-Repertoires des Schweins charakterisiert und der von Menschen als sehr ähnlich befunden. Somit war die Verwendung des Schweins als Tiermodell zur weiteren Erforschung der $\gamma\delta$ T-Zellen gerechtfertigt.

In dieser Arbeit richteten wir unser Augenmerk zum einen auf die pränatale Entwicklung des TCR δ Repertoires des Schweins, zum anderen darauf, welchen Einfluß Mikroorganismen auf das postnatale TCR δ Repertoire des Schweins nehmen. Auf diese Weise sollte die Frage beantwortet werden, ob Fremd- oder Eigenantigene die Selektion und konsekutive Expansion bestimmter $\gamma\delta$ T-Zellklone in der Postnatalperiode bedingen.

Hinsichtlich dieser Fragestellungen führten wir Experimente mit unterschiedlichen Gewebeproben des Schweins durch. Für die Untersuchung der pränatalen Entwicklung des TCR δ Repertoires verwendeten wir Gewebeproben von Schweinefeten unterschiedlichen Alters (38.Tag bis 114. Tag der Tragzeit), die aus den verschiedenen Organen stammten: Dünn- und Dickdarm, Leber, Milz und Thymus. Zusätzlich wurden Zellen des Knochenmarks und des peripheren Blutes untersucht. Für die Untersuchungen zum Einfluß durch Mikroorganismen auf das postnatale TCR δ Repertoire dienten uns Proben von 10 Wochen alten Schweinen, die unter keimfreien (GF) bzw. spezifisch-Pathogen-freien (SPF) Bedingungen aufgezogen wurden. Die Proben wurden aus Dünn- und Dickdarm, mesenterialen Lymphknoten, Milz und Thymus entnommen. Die Amplifikation der TCRDV1-DV5 Transkripte erfolgte mittels RT-PCR, woran sich eine längenabhängige Auftrennung durch denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese (CDR3 Längenanalyse) anschloß. Einzelne dominante Banden wurden aus den Gelen ausgeschnitten, reamplifiziert, teilweise kloniert und anschließend sequenziert.

Unsere Experimente zur pränatalen Entwicklung ergaben, daß das TCR δ Repertoire während der frühen Fetalzeit eingeschränkt war und bei Geburt Polyklonalität aufwies. Die durchschnittliche CDR3 Länge der Transkripte nahm während der Ontogenese zu, was auf eine zunehmende Aktivität des Enzyms TdT schließen läßt. Die zentrale Entdeckung dieser Versuche stellt das invariable DV3 Transkript dar, das in allen Feten während der frühen Gestation (38. Tag der Tragzeit) bis hin zur Geburt (114. Tag der Tragzeit) vorhanden war. Während der Mitte der Gestation, etwa um den 55. Tag der Tragzeit, dominierte dieses invariable DV3 Transkript alle analysierten Organe. Gegen Ende der Gestation, also etwa vom 90. Tag bis zum 114. Tag der Tragzeit, verlor dieses Transkript an Dominanz. Gleichzeitig wurde es aber noch häufig in peripheren Organen wie dem Darm und der Milz gefunden. Im Thymus hingegen konnte es zu dieser Zeit nicht mehr nachgewiesen werden. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß die invariable DV3 Kette gegen Ende der Gestation im Thymus nicht mehr länger entsteht, wohingegen $\gamma\delta$ T-Zellen, die diese invariable Kette tragen, in der Peripherie „überleben“. Die Tatsache, daß

kein anderes invariables TCR δ Transkript, welches in verschiedenen Feten präsent gewesen wäre, identifiziert werden konnte, führt zur Annahme, daß den $\gamma\delta$ T-Zellen, die diesen Rezeptor exprimieren, eine einzigartige Rolle zukommen könnte. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die pränatale Entwicklung des TCR δ Repertoires des Schweins dem des Menschen ähnlich ist. Es ist jedoch anzumerken, daß beim Menschen kein TCR δ Transkript existiert, das das fetale Repertoire in gleicher Weise dominiert. Es bedarf weiterer Untersuchungen in der Zukunft, um die Frage zu klären, ob es sich bei dem invariablen DV3 Transkript des Schweins um das Ergebnis eines vorprogrammierten Rearrangements und/oder einer Selektion durch Eigenantigene handelt, ferner, welche wichtige Funktion es während der fetalen Entwicklung erfüllt.

Unsere Untersuchungen zum Einfluß durch Mikroorganismen auf das postnatale TCR δ Repertoire ergaben keine signifikante Differenz zwischen dem postnatalen TCR δ Repertoire von 10 Wochen alten keimfreien (GF) bzw. spezifisch-Pathogen-freien (SPF) Schweinen und dem bereits in Vorarbeiten beschriebenen Repertoire von gleichaltrigen konventionellen Schweinen. Diese Beobachtung veranlasst zur Annahme, daß eine Selektion bestimmter $\gamma\delta$ T Zellen eher durch Eigenantigene als durch Fremdartigene (z. B. Mikroorganismen) hervorgerufen werden könnte.

6.2 Zusammenfassung in englischer Sprache

T cells can be classified in two different groups, according to their expressed T-cell-receptor: the major group consists of $\alpha\beta$ T-cells and the minor one of $\gamma\delta$ T-cells. This study deals with $\gamma\delta$ T-cells, as they represent an interesting cell-group, on which only limited data are available. $\gamma\delta$ T-cells being disproportionally accumulated at mucosal sites, an area which is faced to a variety of antigens, are thought to form a first line of defence. In addition, several studies support the notion that $\gamma\delta$ T-cells play a key role in the pathogenesis of many diseases, for example the Inflammatory Bowel Disease (IBD). As a member of the immunsystem, $\gamma\delta$ T-cells seem to contribute to the innate and acquired immunity; furthermore they function as a link between the former and the latter.

In order to establish a large animal model for analyzing the effects of age and microbial factors on $\gamma\delta$ T-cells previous studies characterized the postnatal development of the porcine $\gamma\delta$ T-cell-receptor(TCR)-repertoire. These experiments revealed similarities between the ontogeny and the the restriction of the porcine and the human TCR δ repertoire indicating that the pig can be used as a good animal model for extending the knowledge about $\gamma\delta$ T-cells.

Our experiments focused on the prenatal development of the porcine TCR δ repertoire and additionally on the influence upon the postnatal porcine TCR δ repertoire caused by microorganisms. The question to be answered is if foreign or self-antigen is responsible for selection and consequent expansion of certain $\gamma\delta$ T-cells in the postnatal period.

In order to analyze the prenatal development of the TCR δ repertoire specimens from fetal piglets of different age (between 38 and 114 days of gestation) were obtained: small and large intestine, spleen, thymus, liver, bone marrow and peripheral blood monocyte cells. Experiments concerning the influence upon the postnatal TCR δ repertoire caused by microorganisms were performed by using samples from 10 week old pigs which had been raised under germfree

(GF) respectively specific-pathogen-free (SPF) conditions. Tissue samples derived from small and large intestine, mesenteric lymph nodes, spleen and thymus. TCRD1-DV5 transcripts were amplified by RT-PCR and size separated by denaturing PAGE. Individual dominant bands were excised from the gels, reamplified and sequenced. In some cases cloning was necessary before sequencing.

Our experiments concerning the prenatal development revealed, that the porcine TCR δ repertoire was restricted early at gestation and polyclonal at birth. In addition, the average CDR3 length increased with ontogeny which suggests an increasing activity of the enzyme TdT. The central finding of this study is the invariant DV3 transcript which was present in all fetuses from early gestation (day 38 of gestation) until birth (day 114 of gestation). At mid gestation, around day 55 of gestation, this invariant DV3 transcript dominated all organs analyzed. At the end of gestation around day 90 to 114 this transcript was less dominant but still frequently found in peripheral organs like the intestine and spleen. However, it was absent in the thymus, suggesting that at the end of gestation the invariant DV3 chain is no longer rearranged in the thymus whereas $\gamma\delta$ T-cells carrying this invariant chain "survive" in the periphery. No other dominant TCR δ transcript, which was present in different fetuses, could be identified, suggesting a unique role for $\gamma\delta$ T-cells expressing this receptor. In conclusion, the prenatal development of the porcine TCR δ repertoire resembles that of humans. However, in humans there is no TCR δ transcript which dominates the fetal repertoire. Further studies should be performed to give answer to the question, if the invariant DV3 transcript is the result of programmed rearrangement and/or of selection by (self-)antigens, additionally, which function this transcript during the fetal development has.

Our experiments concerning the influence upon the postnatal TCR δ repertoire caused by microorganisms revealed that there is no significant difference between the postnatale TCR δ repertoire of the 10 week old germfree (GF) respectively specific-pathogen-free (SPF) pig and the TCR δ repertoire of a conventionally raised pig of the same age which has been described in previous studies. This finding suggests that the selection of certain $\gamma\delta$ T-cells is caused by self-antigens rather than by foreign antigens such as microorganisms.

7. Literaturverzeichnis

1. Brandtzaeg P, Farstad IN, Helgeland L. Phenotypes of T cells in the gut. *Chem Immunol* 1998;71:1-26.
2. Deusch K, Luling F, Reich K, Classen M, Wagner H, Pfeffer K. A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the $\gamma\delta$ T cell receptor, the CD8 accessory molecule and preferentially uses the V δ 1 gene segment. *Eur J Immunol* 1991;21:1053-1059.
3. Goodman T, Lefrancois L. Expression of the $\gamma\delta$ T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes. *Nature* 1988;333:855-858.
4. Cerf-Bensussan N, Guy-Grand D. Intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterol Clin North Am* 1991;20:549-576.
5. Spencer J, Isaacson PG, Diss TC, MacDonald TT. Expression of disulfide-linked and non-disulfide-linked forms of the T cell receptor $\gamma\delta$ heterodimer in human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Eur J Immunol* 1989;19:1335-1338.
6. Viney J, MacDonald TT, Spencer J. $\gamma\delta$ T cells in the gut epithelium. *Gut* 1990;31:841-844.
7. Ullrich R, Schieferdecker HL, Ziegler K, Riecken EO, Zeitz M. $\gamma\delta$ T cells in the human intestine express surface markers of activation and are preferentially located in the epithelium. *Cell Immunol* 1990;128:619-627.
8. Halstensen TS, Farstad IN, Scott H, Fausa O, Brandtzaeg P. Intraepithelial TcR $\alpha\beta$ + lymphocytes express CD45RO more often than the TcR $\gamma\delta$ + counterparts in coeliac disease. *Immunology* 1990;71:460-466.
9. Jarry A, Cerf-Bensussan N, Brousse N, Selz F, Guy-Grand D. Subsets of CD3+ (T cell receptor $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$) and CD3- lymphocytes isolated from

- normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *Eur J Immunol* 1990;20:1097-1103.
10. Orlic D, Lev R. An electron microscopic study of intraepithelial lymphocytes in human fetal small intestine. *Lab Invest* 1977;37:554-561.
 11. Spencer J, Dillon SB, Isaacson PG, MacDonald TT. T cell subclasses in fetal human ileum. *Clin Exp Immunol* 1986;65:553-558.
 12. Machado CS, Rodrigues MA, Maffei HV. Gut intraepithelial lymphocyte counts in neonates, infants and children. *Acta Paediatr* 1994;83:1264-1267.
 13. Umesaki Y, Okada Y, Matsumoto S, Imaoka A, Setoyama H. Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC class II molecules and fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the ex-germ-free mouse. *Microbiol Immunol* 1995;39:555-562.
 14. Helgeland L, Vaage JT, Rolstad B, Midtvedt T, Brandtzaeg P. Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V β repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. *Immunology* 1996;89:494-501.
 15. Bandeira A, Mota-Santos T, Itohara S, Degermann S, Heusser C, Tonegawa S, Coutinho A. Localization of $\gamma\delta$ T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization. *J Exp Med* 1990;172:239-244.
 16. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition [published erratum appears in *Nature* 1988 Oct 20;335(6192):744]. *Nature* 1988;334:395-402.
 17. Sartor RB. Cytokines in Intestinal Inflammation: Pathophysiological and Clinical Considerations. *Gastroenterology* 1996;106:533-539.

18. Holtmeier W. Intraepitheliale Lymphozyten: Die erste Garde einer Immunabwehr? In: Kist M, Caspary WF, and Lentze MJ, eds. Ökosystem Darm VII. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1996:187-201.
19. Blumberg RS, Yockey CE, Gross GG, Ebert EC, Balk SP. Human intestinal intraepithelial lymphocytes are derived from a limited number of T cell clones that utilize multiple V β T cell receptor genes. *J Immunol* 1993;150:5144-5153.
20. Holtmeier W, Chowers Y, Lumeng A, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. The δ T cell receptor repertoire in human colon and peripheral blood is oligoclonal irrespective of V region usage. *J Clin Invest* 1995;96:1108-1117.
21. Balk SP, Ebert EC, Blumenthal RL, McDermott FV, Wucherpennig KW, Landau SB, Blumberg RS. Oligoclonal expansion and CD1 recognition by human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Science* 1991;253:1411-1415.
22. Chowers Y, Holtmeier W, Harwood J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. The V δ 1 T cell receptor repertoire in human small intestine and colon. *J Exp Med* 1994;180:183-190.
23. Gross GG, Schwartz VL, Stevens C, Ebert EC, Blumberg RS, Balk SP. Distribution of dominant T cell receptor β chains in human intestinal mucosa. *J Exp Med* 1994;180:1337-1344.
24. Pluschke G, Taube H, Krawinkel U, Pfeffer K, Wagner H, Classen M, Deusch K. Oligoclonality and skewed T cell receptor V β gene segment expression in in vivo activated human intestinal intraepithelial T lymphocytes. *Immunobiology* 1994;192:77-93.
25. Van Kerckhove C, Russell GJ, Deusch K, Reich K, Bhan AK, DerSimonian H, Brenner MB. Oligoclonality of human intestinal intraepithelial T cells. *J Exp Med* 1992;175:57-63.

26. MacDonald TT, Spencer J. Ontogeny of the gut-associated lymphoid system in man. *Acta Paediatr Suppl* 1994;83:3-5.
27. Brandtzaeg P, Bosnes V, Halstensen TS, Scott H, Sollid LM, Valnes KN. T lymphocytes in human gut epithelium preferentially express the $\alpha\beta$ antigen receptor and are often CD45/UCHL1-positive [published erratum appears in *Scand J Immunol* 1989 Nov;30(5):653]. *Scand J Immunol* 1989;30:123-128.
28. Halstensen TS, Scott H, Brandtzaeg P. Intraepithelial T cells of the TcR $\gamma\delta$ + CD8- and V δ 1/J δ 1+ phenotypes are increased in coeliac disease. *Scand J Immunol* 1989;30:665-672.
29. Farstad IN, Halstensen TS, Fausa O, Brandtzaeg P. Do human Peyer's patches contribute to the intestinal intraepithelial $\gamma\delta$ T-cell population? *Scand J Immunol* 1993;38:451-458.
30. De Maria R, Fais S, Silvestri M, Frati L, Pallone F, Santoni A, Testi R. Continuous in vivo activation and transient hyporesponsiveness to TcR/CD3 triggering of human gut lamina propria lymphocytes. *Eur J Immunol* 1993;23:3104-3108.
31. Halstensen TS, Brandtzaeg P. Activated T lymphocytes in the celiac lesion: non-proliferative activation (CD25) of CD4+ $\alpha\beta$ cells in the lamina propria but proliferation (Ki-67) of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ cells in the epithelium. *Eur J Immunol* 1993;23:505-510.
32. Moghaddami M, Cummins A, Mayrhofer G. Lymphocyte-filled villi: comparison with other lymphoid aggregations in the mucosa of the human small intestine [see comments]. *Gastroenterology* 1998;115:1414-1425.
33. Oida T, Suzuki K, Nanno M, Kanamori Y, Saito H, Kubota E, Kato S, Itoh M, Kaminogawa S, Ishikawa H. Role of gut cryptopatches in early extrathymic maturation of intestinal intraepithelial T cells. *J Immunol* 2000;164:3616-3626.

34. von Andrian UH, Mackay CR. Advances in immunology: T-cell function and migration - Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 2000;343:1020-1033.
35. Cepek KL, Shaw SK, Parker CM, Russell GJ, Morrow JS, Rimm DL, Brenner MB. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the $\alpha E\beta 7$ integrin. *Nature* 1994;372:190-193.
36. Kunkel EJ, Campbell DJ, Butcher EC. Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity. *Microcirculation* 2003;10:313-323.
37. Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted $\alpha\beta^+$ T cells. *Nature* 1994;372:691-694.
38. Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA, Prigozy TI, Mazzaccaro RJ, Soriano T, Bloom BR, Brenner MB, Kronenberg M, Brennan PJ. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* 1995;269:227-230.
39. Groh V, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker LJ, Anderson T, Warnke RA, Bhan AK, Strominger JL, Brenner MB. Human lymphocytes bearing T cell receptor $\gamma\delta$ are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med* 1989;169:1277-1294.
40. Lefrancois L. Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *J Immunol* 1991;147:1746-1751.
41. Kaufmann SHE. $\gamma\delta$ and other unconventional T Lymphocytes - What do they see and what do they do. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:2272-2279.
42. Mowat AM, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 1997;156:145-166.

43. Klein JR. Whence the intestinal intraepithelial lymphocyte? [comment]. *J Exp Med* 1996;184:1203-1206.
44. Li H, Lebedeva MI, Llera AS, Fields BA, Brenner MB, Mariuzza RA. Structure of the V δ domain of a human $\gamma\delta$ T-cell antigen receptor. *Nature* 1998;391:502-506.
45. Wilson IA, Stanfield RL. Unraveling the mysteries of $\gamma\delta$ T cell recognition. *Nat Immunol* 2001;2:579-581.
46. Allison TJ, Winter CC, Fournie JJ, Bonneville M, Garboczi DN. Structure of a human $\gamma\delta$ T-cell antigen receptor. *Nature* 2001;411:820-824.
47. Holtmeier W, Pfänder M, Hennemann A, Zollner TM, Kaufmann R, Caspary WF. The TCR δ repertoire in normal human skin is restricted and distinct from the TCR δ repertoire in the peripheral blood. *J Invest Dermatol* 2001;116:275-280.
48. Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, Poquet Y, Puzo G, Bonneville M, Fournie JJ. Stimulation of human $\gamma\delta$ T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 1994;264:267-270.
49. Tanaka Y, Morita CT, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells. *Nature* 1995;375:155-158.
50. Behr C, Poupot R, Peyrat MA, Poquet Y, Constant P, Dubois P, Bonneville M, Fournie JJ. *Plasmodium falciparum* stimuli for human $\gamma\delta$ T cells are related to phosphorylated antigens of mycobacteria. *Infect Immun* 1996;64:2892-2896.
51. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:12445-12450.

52. Fisch P, Malkovsky M, Kovats S, Sturm E, Braakman E, Klein BS, Voss SD, Morrissey LW, DeMars R, Welch WJ. Recognition by human V γ 9/V δ 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science* 1990;250:1269-1273.
53. Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells. *Science* 1998;279:1737-1740.
54. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999;285:727-729.
55. Wu J, Groh V, Spies T. T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial $\gamma\delta$ T cells. *J Immunol* 2002;169:1236-1240.
56. Jameson J, Witherden D, Havran WL. T-cell effector mechanisms: $\gamma\delta$ and CD1d-restricted subsets. *Curr Opin Immunol* 2003;15:349-353.
57. Boismenu R, Havran WL. Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial $\gamma\delta$ T cells. *Science* 1994;266:1253-1255.
58. Havran WL. A role for epithelial $\gamma\delta$ T cells in tissue repair. *Immunologic Research* 2000;21:63-69.
59. Chen YP, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial $\gamma\delta$ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:14338-14343.
60. Workalemahu G, Foerster M, Kroegel C, Braun RK. Human $\gamma\delta$ -T lymphocytes express and synthesize connective tissue growth factor: Effect of IL-15 and TGF- β 1 and comparison with $\alpha\beta$ -T lymphocytes. *J Immunol* 2003;170:153-157.

61. Hsieh B, Schrenzel MD, Mulvania T, Lepper HD, DiMolfetto-Landon L, Ferrick DA. In vivo cytokine production in murine listeriosis. Evidence for immunoregulation by $\gamma\delta$ T cells. *J Immunol* 1996;156:232-237.
62. Lagler H, Willheim M, Traunmuller F, Wahl K, Winkler H, Ramharter M, Graninger W, Winkler S. Cellular profile of cytokine production in a patient with visceral leishmaniasis: $\gamma\delta$ T cells express both type 1 cytokines and interleukin-10. *Scand J Immunol* 2003;57:291-295.
63. Komano H, Fujiura Y, Kawaguchi M, Matsumoto S, Hashimoto Y, Obana S, Mombaerts P, Tonegawa S, Yamamoto H, Itohara S. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial $\gamma\delta$ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:6147-6151.
64. Shen Y, Zhou DJ, Qiu LY, Lai XM, Simon M, Shen L, Kou ZC, Wang QF, Jiang JM, Estep J, Hunt R, Clagett M, Sehgal PK, Li YY, Zeng XJ, Morita CT, Brenner MB, Letvin NL, Chen ZW. Adaptive immune response of V γ 2V δ 2(+) T cells during mycobacterial infections. *Science* 2002;295:2255-2258.
65. Leslie DS, Vincent MS, Spada FM, Das H, Sugita M, Morita CT, Brenner MB. CD1-mediated $\gamma\delta$ T cell maturation of dendritic cells. *J Exp Med* 2002;196:1575-1584.
66. Vincent MS, Leslie DS, Gumperz JE, Xiong X, Grant EP, Brenner MB. CD1-dependent dendritic cell instruction. *Nat Immunol* 2002;3:1163-1168.
67. Ismaili J, Olislagers V, Poupot R, Fournie JJ, Goldman M. Human $\gamma\delta$ T cells induce dendritic cell maturation. *Clin Immunol* 2002;103:296-302.
68. Spada FM, Grant EP, Peters PJ, Sugita M, Melian A, Leslie DS, Lee HK, van Donselaar E, Hanson DA, Krensky AM, Majdic O, Porcelli SA, Morita CT, Brenner MB. Self-recognition of CD1 by $\gamma\delta$ T cells: Implications for innate immunity. *J Exp Med* 2000;191:937-948.

69. Belles C, Kuhl AK, Donoghue AJ, Sano Y, O'Brien RL, Born W, Bottomly K, Carding SR. Bias in the $\gamma\delta$ T cell response to *Listeria monocytogenes*. V δ 6.3+ cells are a major component of the $\gamma\delta$ T cell response to *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 1996;156:4280-4289.
70. Carding SR, Egan PJ. The importance of $\gamma\delta$ T cells in the resolution of pathogen-induced inflammatory immune responses. *Immunol Rev* 2000;173:98-108.
71. Shen Y, Li S, Quayle AJ, Mellbye OJ, Natvig JB, Forre O. TCR $\gamma\delta$ + cell subsets in the synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 1992;36:533-540.
72. Wucherpfennig KW, Newcombe J, Li H, Keddy C, Cuzner ML, Hafler DA. $\gamma\delta$ T-cell receptor repertoire in acute multiple sclerosis lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:4588-4592.
73. Powrie F. T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. *Immunity* 1995;3:171-174.
74. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;109:1344-1367.
75. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* 1994;1:553-562.
76. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Tonegawa S, Bhan AK. Alteration of a polyclonal to an oligoclonal immune response to cecal aerobic bacterial antigens in TCR α mutant mice with inflammatory bowel disease. *Int Immunol* 1996;8:1387-1394.
77. Matsuda JL, Gapin L, Sydora BC, Byrne F, Binder S, Kronenberg M, Aranda R. Systemic activation and antigen-driven oligoclonal expansion of T cells in a mouse model of colitis. *J Immunol* 2000;164:2797-2806.

78. Hoffmann JC, Peters K, Henschke S, Herrmann B, Pfister K, Westermann J, Zeitz M. Role of T lymphocytes in rat 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) induced colitis: increased mortality after $\gamma\delta$ T cell depletion and no effect of $\alpha\beta$ T cell depletion. Gut 2001;48:489-495.
79. Kuhl AA, Loddenkemper C, Westermann J, Hoffmann JC. Role of $\gamma\delta$ T cells in inflammatory bowel disease. Pathobiology 2002;70:150-155.
80. Barnes PF, Grisso CL, Abrams JS, Band H, Rea TH, Modlin RL. $\gamma\delta$ T lymphocytes in human tuberculosis. J Infect Dis 1992;165:506-512.
81. Li B, Rossman MD, Imir T, Oner-Eyuboglu AF, Lee CW, Biancaniello R, Carding SR. Disease-specific changes in $\gamma\delta$ T cell repertoire and function in patients with pulmonary tuberculosis. J Immunol 1996;157:4222-4229.
82. Ho M, Tongtawe P, Kriangkum J, Wimonwattrawatee T, Pattanapanyasat K, Bryant L, Shafiq J, Suntharsamai P, Looareesuwan S, Webster HK. Polyclonal expansion of peripheral $\gamma\delta$ T cells in human *Plasmodium falciparum* malaria. Infect Immun 1994;62:855-862.
83. Boullier S, Cochet M, Poccia F, Gougeon ML. CDR3-independent $\gamma\delta$ V δ 1+ T cell expansion in the peripheral blood of HIV-infected persons. J Immunol 1995;154:1418-1431.
84. Ferrarini M, Ferrero E, Dagna L, Poggi A, Zocchi MR. Human $\gamma\delta$ T cells: a nonredundant system in the immune-surveillance against cancer. Trends Immunol 2002;23:14-18.
85. Maeurer MJ, Martin D, Walter W, Liu K, Zitvogel L, Haluszczak KXRH, Duquesnoy R, Storkus W, Lotze MT. Human intestinal V δ 1+ lymphocytes recognize tumor cells of epithelial origin. J Exp Med 1996;183:1681-1696.

86. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, Hobby P, Sutton B, Tigelaar RE, Hayday AC. Regulation of cutaneous malignancy by $\gamma\delta$ T cells. *Science* 2001;294:605-609.
87. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002;419:734-738.
88. Rellahan BL, Bluestone JA, Houlden BA, Cotterman MM, Matis LA. Junctional sequences influence the specificity of $\gamma\delta$ T cell receptors. *J Exp Med* 1991;173:503-506.
89. Rock EP, Sibbald PR, Davis MM, Chien YH. CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J Exp Med* 1994;179:323-328.
90. Hayday AC. $\gamma\delta$ cells: A right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* 2000;18:975-1026.
91. Chien YH, Iwashima M, Kaplan KB, Elliott JF, Davis MM. A new T-cell receptor gene located within the α locus and expressed early in T-cell differentiation. *Nature* 1987;327:677-682.
92. Genevee C, Chung V, Diu A, Hercend T, Triebel F. TCR gene segments from at least one third of $V\alpha$ subfamilies rearrange at the δ locus. *Mol Immunol* 1994;31:109-115.
93. Guglielmi P, Davi F, D'Auriol L, Bories J-C, Dausset J, Bensussan A. Use of a variable α region to create a functional T-cell receptor δ chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:5634-5638.
94. Hata S, Clabby M, Devlin P, Spits H, de Vries JE, Krangel MS. Diversity and organization of human T cell receptor δ variable gene segments. *J Exp Med* 1989;169:41-57.
95. Takiyama Y, Champagne E, Ciccone E, Moretta A, Minden M, Mak TW. Organization and orientation of a human T cell receptor δ chain V gene

- segment that suggests an inversion mechanism is utilized in its rearrangement. *Eur J Immunol* 1989;19:571-574.
96. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302:575-581.
97. Takihara Y, Reimann J, Michalopoulos E, Ciccone E, Moretta L, Mak TW. Diversity and structure of human T cell receptor δ chain genes in peripheral blood $\gamma\delta$ bearing T lymphocytes. *J Exp Med* 1989;169:393-405.
98. Casorati G, Migone N. The TCR V δ repertoire and the restricted TCR V gene expression and pairing. *Res Immunol* 1990;141:624-625.
99. McVay LD, Carding SR. Extrathymic origin of human $\gamma\delta$ T cells during fetal development. *J Immunol* 1996;157:2873-2882.
100. McVay LD, Jaswal SS, Kennedy C, Hayday A, Carding SR. The generation of human $\gamma\delta$ T cell repertoires during fetal development. *J Immunol* 1998;160:5851-5860.
101. Krangel MS, Yssel H, Brocklehurst C, Spits H. A distinct wave of human T cell receptor $\gamma\delta$ lymphocytes in the early fetal thymus: evidence for controlled gene rearrangement and cytokine production. *J Exp Med* 1990;172:847-859.
102. Wucherpfennig KW, Liao YJ, Prendergast M, Prendergast J, Hafler DA, Strominger JL. Human fetal liver $\gamma\delta$ T cells predominantly use unusual rearrangements of the T cell receptor δ and γ loci expressed on both CD4⁺CD8⁻ and CD4⁻CD8⁻ $\gamma\delta$ T cells. *J Exp Med* 1993;177:425-432.
103. McVay LD, Carding SR. Generation of human $\gamma\delta$ T-cell repertoires. *Crit Rev Immunol* 1999;19:431-460.
104. Asarnow DM, Cado D, Raulet DH. Selection is not required to produce invariant T-cell receptor γ -gene junctional sequences. *Nature* 1993;362:158-160.

105. Lafaille JJ, DeCloux A, Bonneville M, Takagaki Y, Tonegawa S. Junctional sequences of T cell receptor $\gamma\delta$ genes: implications for $\gamma\delta$ T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell* 1989;59:859-870.
106. Kyes S, Pao W, Hayday A. Influence of site of expression on the fetal $\gamma\delta$ T-cell receptor repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:7830-7833.
107. Itohara S, Tonegawa S. Selection of $\gamma\delta$ T cells with canonical T-cell antigen receptors in fetal thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:7935-7938.
108. Bonati A, Zanelli P, Ferrari S, Plebani A, Starcich B, Savi M, Neri TM. T-cell receptor β -chain gene rearrangement and expression during human thymic ontogenesis. *Blood* 1992;79:1472-1483.
109. George JFJ, Schroeder HWJ. Developmental regulation of D β reading frame and junctional diversity in T cell receptor- β transcripts from human thymus. *J Immunol* 1992;148:1230-1239.
110. Miyagawa Y, Matsuoka T, Baba A, Nakamura T, Tsuno T, Tamura A, Agematsu K, Yabuhara A, Uehara Y, Kawai H. Fetal liver T cell receptor $\gamma\delta^+$ T cells as cytotoxic T lymphocytes specific for maternal alloantigens. *J Exp Med* 1992;176:1-7.
111. Davodeau F, Peyrat MA, Hallet MM, Gaschet J, Houde I, Vivien R, Vie H, Bonneville M. Close correlation between Daudi and mycobacterial antigen recognition by human $\gamma\delta$ T cells and expression of V9JPC1 γ /V2DJC δ -encoded T cell receptors. *J Immunol* 1993;151:1214-1223.
112. Bukowski JF, Morita CT, Tanaka Y, Bloom BR, Brenner MB, Band H. V γ 2V δ 2 TCR-dependent recognition of non-peptide antigens and Daudi cells analyzed by TCR gene transfer. *J Immunol* 1995;154:998-1006.

113. Holtmeier W, Witthöft T, Hennemann A, Winter HS, Kagnoff MF. The TCR- δ repertoire in human intestine undergoes characteristic changes during fetal to adult development. *J Immunol* 1997;158:5632-5641.
114. Chermann JC. Sexual and mother-to-child transmission of the human immunodeficiency virus type 1: a review. *Am J Reprod Immunol* 1998;40:183-186.
115. Li Q, Tsang B, Ding L, Ding ZR. Vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1: frequency and correlation of transmission (review). *Int J Mol Med* 1998;1:589-591.
116. Stratton P, Tuomala RE, Abboud R, Rodriguez E, Rich K, Pitt J, Diaz C, Hammill H, Minkoff H. Obstetric and newborn outcomes in a cohort of HIV-infected pregnant women: a report of the women and infants transmission study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999;20:179-186.
117. Bogue M, Gilfillan S, Benoist C, Mathis D. Regulation of N-region diversity in antigen receptors through thymocyte differentiation and thymus ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:11011-11015.
118. Beldjord K, Beldjord C, Macintyre E, Even P, Sigaux F. Peripheral selection of V δ 1+ cells with restricted T cell receptor δ gene junctional repertoire in the peripheral blood of healthy donors. *J Exp Med* 1993;178:121-127.
119. Giachino C, Granziero L, Modena V, Maiocco V, Lomater C, Fantini F, Lanzavecchia A, Migone N. Clonal expansions of V δ 1+ and V δ 2+ cells increase with age and limit the repertoire of human $\gamma\delta$ T cells. *Eur J Immunol* 1994;24:1914-1918.
120. Hingorani R, Choi IH, Akolkar P, Gulwani-Akolkar B, Pergolizzi R, Silver J, Gregersen PK. Clonal predominance of T cell receptors within the CD8+ CD45RO+ subset in normal human subjects. *J Immunol* 1993;151:5762-5769.

121. Posnett DN, Sinha R, Kabak S, Russo C. Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy" [published erratum appears in J Exp Med 1994 Mar 1;179(3):1077]. J Exp Med 1994;179:609-618.
122. Fitzgerald JE, Ricalton NS, Meyer AC, West SG, Kaplan H, Behrendt C, Kotzin BL. Analysis of clonal CD8+ T cell expansions in normal individuals and patients with rheumatoid arthritis. J Immunol 1995;154:3538-3547.
123. Poccia F, Gougeon ML, Bonneville M, Lopez-Botet M, Moretta A, Battistini L, Wallace M, Colizzi V, Malkovsky M. Innate T-cell immunity to nonpeptidic antigens. Immunol Today 1998;19:253-256.
124. Morita CT, Lee HK, Leslie DS, Tanaka Y, Bukowski JF, Marker-Hermann E. Recognition of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens by human $\gamma\delta$ T cells. Microbes Infect 1999;1:175-186.
125. Parker CM, Groh V, Band H, Porcelli SA, Morita C, Fabbi M, Glass D, Strominger JL, Brenner MB. Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor $\gamma\delta$ repertoire. J Exp Med 1990;171:1597-1612.
126. Kohsaka H, Chen PP, Taniguchi A, Ollier WE, Carson DA. Divergent T cell receptor γ repertoires in rheumatoid arthritis monozygotic twins. Arthritis Rheum 1993;36:213-221.
127. Kohsaka H, Taniguchi A, Chen PP, Ollier WE, Carson DA. The expressed T cell receptor V gene repertoire of rheumatoid arthritis monozygotic twins: rapid analysis by anchored polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. Eur J Immunol 1993;23:1895-1901.
128. Regnault A, Levraud JP, Lim A, Six A, Moreau C, Cumano A, Kourilsky P. The expansion and selection of T cell receptor $\alpha\beta$ intestinal intraepithelial T cell clones. Eur J Immunol 1996;26:914-921.

129. Rothkötter HJ, Pabst R, Bailey M. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa: entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;72:157-165.
130. Sinkora M, Sinkora J, Rehakova Z, Splichal I, Yang H, Parkhouse RME, Trebichavsky I. Prenatal ontogeny of lymphocyte subpopulations in pigs. *Immunology* 1998;95:595-603.
131. Yang H, Parkhouse RM. Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology* 1996;89:76-83.
132. Yang H, Oura CA, Kirkham PA, Parkhouse RM. Preparation of monoclonal anti-porcine CD3 antibodies and preliminary characterization of porcine T lymphocytes. *Immunology* 1996;88:577-585.
133. Boeker M, Pabst R, Rothkötter HJ. Quantification of B, T and null lymphocyte subpopulations in the blood and lymphoid organs of the pig. *Immunobiology* 1999;201:74-87.
134. Holtmeier W, Käller J, Geisel W, Pabst R, Caspary WF, Rothkötter HJ. Development and compartmentalization of the porcine TCR δ repertoire at mucosal and extraintestinal sites: The pig as a model for analyzing the effects of age and microbial factors. *J Immunol* 2002;169:1993-2002.
135. Sinkora M, Sinkora J, Rehakova Z, Butler JE. Early ontogeny of thymocytes in pigs: Sequential colonization of the thymus by T cell progenitors. *J Immunol* 2000;165:1832-1839.
136. Trebichavsky I, Tlaskalova H, Cukrowska B, Splichal I, Sinkora J, Oehakova Z, Sinkora M, Pospisil R, Kovaou F, Charley B, Binns R, White A. Early ontogeny of immune cells and their functions in the fetal pig. *Vet Immunol Immunopathol* 1996;54:75-81.
137. Sinkora J, Rehakova Z, Sinkora M, Cukrowska B, Tlaskalova-Hogenova H. Early development of immune system in pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;87:301-306.

138. Pardoll DM, Fowlkes BJ, Bluestone JA, Kruisbeek A, Maloy WL, Coligan JE, Schwartz RH. Differential expression of two distinct T-cell receptors during thymocyte development. *Nature* 1987;326:79-81.
139. Chen CL, Cihak J, Losch U, Cooper MD. Differential expression of two T cell receptors, TcR1 and TcR2, on chicken lymphocytes. *Eur J Immunol* 1988;18:539-543.
140. Maddox JF, Mackay CR, Brandon MR. Ontogeny of ovine lymphocytes. I. An immunohistological study on the development of T lymphocytes in the sheep embryo and fetal thymus. *Immunology* 1987;62:97-105.
141. Kuhnlein P, Vicente A, Varas A, Hunig T, Zapata A. $\gamma\delta$ T cells in fetal, neonatal, and adult rat lymphoid organs. *Dev Immunol* 1995;4:181-188.
142. Binns RM, Duncan IA, Powis SJ, Hutchings A, Butcher GW. Subsets of null and $\gamma\delta$ T-cell receptor+ T lymphocytes in the blood of young pigs identified by specific monoclonal antibodies. *Immunology* 1992;77:219-227.
143. Davis WC, Zuckermann FA, Hamilton MJ, Barbosa JI, Saalmüller A, Binns RM, Licence ST. Analysis of monoclonal antibodies that recognize $\gamma\delta$ T/null cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;60:305-316.
144. Thome M, Saalmüller A, Pfaff E. Molecular cloning of porcine T cell receptor α , β , γ and δ chains using polymerase chain reaction fragments of the constant regions. *Eur J Immunol* 1993;23:1005-1010.
145. Yang YG, Ohta S, Yamada S, Shimizu M, Takagaki Y. Diversity of T cell receptor δ -chain cDNA in the thymus of a one-month-old pig. *J Immunol* 1995;155:1981-1993.
146. Uenishi H, Hiraiwa H, Yamamoto R, Yasue H, Takagaki Y, Shiina T, Kikkawa E, Inoko H, Awata T. Genomic structure around joining segments and constant regions of swine T-cell receptor $\alpha\delta$ (TRA/TRD) locus. *Immunology* 2003;109:515-526.

147. Zhang Y, Cado D, Asarnow DM, Komori T, Alt FW, Raulet DH, Allison JP. The role of short homology repeats and TdT in generation of the invariant $\gamma\delta$ antigen receptor repertoire in the fetal thymus. *Immunity* 1995;3:439-447.
148. Itohara S, Mombaerts P, Lafaille J, Iacomini J, Nelson A, Clarke AR, Hooper ML, Farr A, Tonegawa S. T cell receptor δ gene mutant mice: independent generation of $\alpha\beta$ T cells and programmed rearrangements of $\gamma\delta$ TCR genes. *Cell* 1993;72:337-348.
149. Cahill RN, Kimpton WG, Washington EA, Walker ID. Origin and development of the $\gamma\delta$ T-cell system in sheep: a critical role for the thymus in the generation of TcR diversity and tissue tropism. *Semin Immunol* 1996;8:351-360.
150. Cunningham CP, Cahill RN, Washington EA, Holder JE, Twohig JP, Kimpton WG. Regulation of T cell homeostasis during fetal and early postnatal life. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;72:175-181.
151. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor- derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6879-6884.
152. Imaoka A, Matsumoto S, Setoyama H, Okada Y, Umesaki Y. Proliferative recruitment of intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization of germ-free mice. *Eur J Immunol* 1996;26:945-948.
153. Pabst R, Rothkötter HJ. Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;72:167-173.
154. Barman NN, Bianchi AT, Zwart RJ, Pabst R, Rothkötter HJ. Jejunal and ileal Peyer's patches in pigs differ in their postnatal development. *Anatomy & Embryology* 1997;195:41-50.
155. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5463-5467.

-
156. Lafaille JJ, Haas W, Coutinho A, Tonegawa S. Positive selection of $\gamma\delta$ T cells. *Immunol Today* 1990;11:75-78.
 157. Sim GK, Augustin A. Dominantly inherited expression of BID, an invariant undiversified T cell receptor δ chain. *Cell* 1990;61:397-405.
 158. Havran WL, Carbone A, Allison JP. Murine T cells with invariant $\gamma\delta$ antigen receptors: origin, repertoire, and specificity. *Semin Immunol* 1991;3:89-97.
 159. Sim GK, Augustin A. Dominant expression of the T cell receptor BALB invariant δ (BID) chain in resident pulmonary lymphocytes is due to selection. *Eur J Immunol* 1991;21:859-861.
 160. Itohara S, Farr AG, Lafaille JJ, Bonneville M, Takagaki Y, Haas W, Tonegawa S. Homing of a $\gamma\delta$ thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. *Nature* 1990;343:754-757.
 161. Dunon D, Courtois D, Vainio O, Six A, Chen CH, Cooper MD, Dangy JP, Imhof BA. Ontogeny of the immune system: $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T cells migrate from thymus to the periphery in alternating waves. *J Exp Med* 1997;186:977-988.
 162. Asarnow DM, Kuziel WA, Bonyhadi M, Tigelaar RE, Tucker PW, Allison JP. Limited diversity of $\gamma\delta$ antigen receptor genes of Thy- 1+ dendritic epidermal cells. *Cell* 1988;55:837-847.
 163. Havran WL, Allison JP. Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T-cell antigen receptors. *Nature* 1988;335:443-445.
 164. Butler JE, Weber P, Sinkora M, Sun J, Ford SJ, Christenson RK. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. II. Characterization of heavy chain complementarity-determining region 3 diversity in the developing fetus. *J Immunol* 2000;165:6999-7010.

165. Zemlin M, Schelonka RL, Bauer K, Schroeder HW. Regulation and chance in the ontogeny of B and T cell antigen receptor repertoires. *Immunologic Research* 2002;26:265-278.
166. Feeney AJ. Junctional diversity in the absence of N regions. Neonatal T cell receptor β chain junctional sequences are more heterogeneous than neonatal T cell receptor $\gamma\delta$ or IgH junctions. *J Immunol* 1993;151:3094-3099.
167. Gu H, Forster I, Rajewsky K. Sequence homologies, N sequence insertion and JH gene utilization in VHDJH joining: implications for the joining mechanism and the ontogenetic timing of Ly1 B cell and B-CLL progenitor generation. *EMBO J* 1990;9:2133-2140.
168. Feeney AJ, Victor KD, Vu K, Nadel B, Chukwuocha RU. Influence of the V(D)J recombination mechanism on the formation of the primary T and B cell repertoires. *Semin Immunol* 1994;6:155-163.
169. McVay LD, Carding SR, Bottomly K, Hayday AC. Regulated expression and structure of T cell receptor $\gamma\delta$ transcripts in human thymic ontogeny. *EMBO J* 1991;10:83-91.
170. Havran WL, Chien YH, Allison JP. Recognition of self antigens by skin-derived T cells with invariant $\gamma\delta$ antigen receptors. *Science* 1991;252:1430-1432.
171. Mukasa A, Born WK, O'Brien RL. Inflammation alone evokes the response of a TCR-invariant mouse $\gamma\delta$ T cell subset. *J Immunol* 1999;162:4910-4913.
172. Rakasz E, MacDougall AV, Zayas MT, Helgelund JL, Ruckward TJ, Hatfield G, Dykhuizen M, Mitchen JL, Evans PS, Pauza CD. $\gamma\delta$ T cell receptor repertoire in blood and colonic mucosa of rhesus macaques. *J Med Primatol* 2000;29:387-396.

-
173. MacDougall AV, Enders P, Hatfield G, Pauza DC, Rakasz E. V γ 2 TCR repertoire overlap in different anatomical compartments of healthy, unrelated rhesus macaques. *J Immunol* 2001;166:2296-2302.
 174. Rothkötter HJ, Ulbrich H, Pabst R. The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation, and T and B cell subsets in conventional and germ-free pigs. *Pediatr Res* 1991;29:237-242.

8. Anhang

8.1 Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. W. Caspary für die Überlassung des Themas sowie der Bereitstellung der Laborräume bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt weiterhin Herrn PD Dr. med. W. Holtmeier für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die kontinuierliche Unterstützung bei auftretenden Problemen während der Durchführung des experimentellen Teils. Auch bei der schriftlichen Abfassung dieser Arbeit war es ihm eine Selbstverständlichkeit, sich genügend Zeit zu nehmen und mir mit seinen Ratschlägen zur Seite zu stehen, wodurch eine zügige Fertigstellung der Arbeit ermöglicht wurde.

Zudem möchte ich meinen Dank gegenüber Herrn Professor Dr. med. R. Pabst und Herrn Professor Dr. med. H.J. Rothkötter aussprechen, die einen Teil der Gewebeproben bereitstellten. Zudem bin ich ihnen sehr dankbar, daß sie mir die Assistenz bei einer Probenentnahme bei einem der Schweine ermöglichten.

Herrn Dr. phil. nat. A. Hennemann danke ich für die sorgfältige Einarbeitung in der Methodik. Ich konnte mich zu jeder Zeit mit fachlichen Fragen und Problemen an ihn wenden.

Auch Sunita Bahník, der ehemaligen Medizinisch Technischen Labor-Assistentin unserer Arbeitsgruppe, möchte ich meinen Dank aussprechen, die mir zum einen bei technischen Fragen weiterhalf und mit der zum anderen die Zusammenarbeit in dem kleinen Labor sehr freundschaftlich war.

Weiterhin geht mein Dank an Frau Sandra Paßmann, der Medizinisch Technischen Labor-Assistentin unserer Arbeitsgruppe, die hinsichtlich der Fragen, die nach Abschluß meiner Experimente aufkamen, immer hilfsbereit war.

Von Herzen danke ich Eva Valesky, Florian Schübel, Judith Käller, Inga Wriedt und Peter Kirst, die mit einer Selbstverständlichkeit die Stimmungstiefs, die gelegentlich während des experimentellen Teils der Arbeit als auch bei der schriftlichen Fertigstellung auftraten, erduldeten und nicht mit Ermutigungen geizten.

Schließlich geht mein Dank an meine Familie. Ich danke meinen Eltern für die Unterstützung jeglicher Art, durch die die reibungslose Absolvierung des Studiums und Durchführung dieser Arbeit ermöglicht wurde. Außerdem möchte ich mich bei meinem Bruder Armin für die Lösung der kleinen technischen Probleme bei der schriftlichen Abfassung der Arbeit bedanken.

8.2 Wissenschaftliche Publikationen

- 1) Holtmeier, W., Kaller, J., Geisel, W., Pabst, R., Caspary, W. F., Rothkotter, H., J., Development and compartmentalization of the porcine TCR δ repertoire at mucosal and extraintestinal sites: the pig as a model for analyzing the effects of age and microbial factors. *The Journal of Immunology*, 2002, 169:1993-2002
- 2) Holtmeier, W., Geisel, W., Bernert, K., Butler, J., Sinkora, M., Rehakova, Z., Caspary, W. F. Prenatal development of the porcine TCR δ repertoire: dominant expression of an invariant T cell receptor V δ 3-J δ 3 chain. *European Journal of Immunology*, 2004, 34: 1941-1949
- 3) Holtmeier, W., Geisel, W., Butler, J., Sinkora, M., Sinkora, J., Caspary, W. F. Prenatal development of the intestinal and extraintestinal T cell receptor δ repertoire: identical, dominant DV3 transcripts are present in different fetal piglets. Digestive Disease week 2003; Orlando, Florida; *Gastroenterology* 2003
- 4) Arbeit Nr. 3 erhielt im September 2003 den 1. Posterpreis. Falk Symposium 135 Immunological diseases of liver and gut, Prag, Tschechische Republik.

8.3 Zusammensetzung der verwendeten Puffer

0,5 x TBE-Puffer

45 mM Tris ($p_H = 8,3$)

+ 45 mM Tris H_3BO_3

+ 1 mM EDTA

(alle *SIGMA*)

1 x TBE-Puffer

89 mM Tris ($p_H = 8,3$)

+ 89 mM Tris H_3BO_3

+ 2 mM EDTA

(alle *SIGMA*)

10 x TBE-Puffer

890 mM Tris ($p_H = 8,3$)

+ 890 mM Tris H_3BO_3

+ 10 mM EDTA

Probenpuffer für Agarosegelelektrophorese der RNA und cDNA

11,5 mM Tris [hydroxymethyl-] aminomethan/HCl ($p_H = 8,0$)

+ 62,5 mM Ethylendiamintetraacetat, Na_2 -EDTA

+ 0,05% Bromphenolblau/Xylencyanol, 50% /v 1-, 2-, 3-Propandtriol

Puffer für PAGE

80% Formamid

+ 10 mM NaOH

+0,05 % Bromphenolblau/Xylencyanol

(alle *SIGMA*)

TE-Puffer

10 mM Tris ($p_H = 8,0$)

+ 1 mM EDTA

6%ige Polyacrylamidlösung

150 ml 40%iger (19 : 1) Acrylamid-/Bisacrylamidlösung (*Roti-phorese Gel 40*,[®] *ROTH*)

+ 7 mol Kohlendäurediamid (*APPLICHEM*)

+ 350 ml HPLC-H₂O (*MALLINCKRODT BAKER*, Griesheim, FRG)

+ 100 ml 10 x TBE-Stammlösung

8.4 Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
$\alpha 4\beta 7$	mukosales Adressin, Ligand von MAdCAM-1
$\alpha E\beta 7$	mukosales Adressin (HML-1), Ligand von E-Cadherin
AS	Aminosäure
Amp	Ampicillin (D- α -Aminobenzylpenicillin)
APC	antigen presenting cell
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat

B

β -Gal	β - Galaktosidase
bp	base pair
bzw	beziehungsweise

C

CD	cluster of differentiation
CD1	MHC I-Klasse ähnliches, Enterozyten spezifisches Antigen
CD2	<i>pan</i> T-Zell „marker“ (LFA-2); bindet spezifisch an SRBC
CD3	<i>pan</i> T-Zell Oberflächenantigen
CD4	Korezeptor α/β^+ T-Helferzellen (Th)
CD8	Korezeptor zytotoxischer oder „Suppressor“ α/β^+ T-Zellen
CD45RA	Oberflächenantigen, welches spezifisch für unstimulierte T-Zellen ist
CD45RO	Oberflächenantigen, das von „Gedächtnis“ T-Zellen exprimiert wird
CD69	Oberflächenantigen, welches aktivierte T-Zellen auszeichnet

cDNA	c omplementary DNA
CDR3	third c omplementarity d etermining r egion (antigenbindende Rezeptordomäne)
CED	c hronisch e ntzündliche D armerkrankungen (<i>M.Crohn</i> , <i>C.ulcerosa</i>)
C-Region	Constant-Region

D

DC	d endritic c ells
ddNTP	2',3'- D idesoxynukleosid- T riphosphat
DEPC d. h.	D iethylpyrocarbonat das heißt
DNA	D esoxyribonucleic a cid
DNase	D esoxyribonukle a se
dNTP	3'- D esoxynukleosid- T riphosphat
D-Region	Diversity-Region
dsDNA	d ouble s tranded DNA (doppelsträngige DNA)
DTT	D ithiothreitol

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	E thylendiamintetraacetat-Natriumsalz (= <i>Titriplex® III</i>)
EtBr	E thidium b romid

G

g	g ravidity (relative Erdbeschleunigung)
GALT GF	g ut-associated lymphoid tissue keimfrei (germfree)

H

HEV	h igh e ndothelial v enules (postkapilläre Venolen lymphoider Organe)
HLA	h uman lymphocyte a ssociated a ntigen

HPLC	h igh p erformance liquid c hromatography
HSP	H itzeschockprotein(e)
HIV	h uman immunodeficiency v irus

I

IEL	i ntraepitheliale L ymphozyten
IFN- γ	G amma- I nterferon (Typ II-Interferon)
IgH	h eavy chain of immunglobulin
IL-2	I nterleukin-2
IL-4	I nterleukin-4
IL-10	I nterleukin-10
IPTG	I sopropyl- β -(D)- T hiogalaktopyranosid

J

J-Region	J oining-Region
----------	------------------------

K

kb	K ilobasen
kD	K ilodalton
KGF	k eratinocyte g rowth f actor (Keratinozyten-Wachstumsfaktor)

L

LB	L uria- B ertani Agar
LP	L amina p ropria
LPL	L amina p ropria L ymphozyten
LFV	L ymphocyte f illed v illi

M

MAdCAM-1	m ucosal a dressin c ell a dhesion m olecule 1 (mukosales Adressin)
mcs	m ultiple c loning s ite (multiple Klonierungsregion)
mes. LK	mesenterialer Lymphknoten
MHC	m ajor h istokompatibility c omplex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MICA/B	MHC class I related chain A/B
MMLV	m urine- m oloney l eukemia virus
mRNA	m essenger- r ibonucleic a cid (Boten-Ribonukleinsäure)
MW	m olecular w eight

N

NAD ⁺	N ikotinam a d e n i n d inukleotid (oxidiert)
NBT	N itro b lau- T etrazoliumchlorid
ng	N anogramm (1 ng = 10 ⁻³ µg)
nm	N anometer (10 ⁻⁹ m)
dNTP	d esoxy- N ukleosid- T ri p hosphat
N-Region	Region matrizenunabhängiger Nukleotide

O

OD ₂₆₀	O ptische D ichte bei der Wellenlänge λ = 260 nm
-------------------	--

P

PBMC	p eripheral b lood m ononuclear c ells (periphere mononukleäre Zellen)
PBS	p hosphate b uffered s aline (phosphatgepufferte Saline, p _H = 7,2)
PCR	p olymerase c hain r eaction (Polymerase-Kettenreaktion)
P _i	p hosphat i norganic (anorganisches Phosphat)
P-Nukleotide	palindromische Mono- oder Dinukleotide
PP	P eyer'sche P laques

ppi	Pyrophosphat
ppm	parts per million
PTFE	Poly-Tetrafluorethylen (<i>Teflon</i> [®])

R

RCF	relative centrifugal force [$RCF = 1,12 r_{\max} \times (\text{rpm}/1000)^2$]
RNA	ribo nucleic acid (Ribonukleinsäure)
rRNA	ribosomale RNA
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
<i>RPMI-1640</i> [®]	Zellkulturmedium (<i>GIBCO BRL</i>)
RT	Raumtemperatur

S

sh	siehe
SAP	shrimp alkaline phosphatase (Alkalische Phosphatase)
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SPF	spezifisch-Pathogen-frei
ssDNA	single stranded DNA

T

TBE	Tris/Borat/EDTA (Elektrophoresepuffer, $p_H = 8,3$)
TCRD	delta T-cell-receptor
TdT	terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
TEMED	N,N,N,'N' - Tetramethyl-Ethylendiamin
Th1	T-Helfer Lymphokinprofil (1): IL-2, IFN- γ , TNF- $\alpha/\beta \Rightarrow$ DTH-Antwort
Th2	Lymphokinprofil (2): IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 \Rightarrow allergische Reaktion
T_m -Wert	Temperatur bei 50%iger „Primer“bindung an die Matrizen-DNA
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha (sekretorische Form = 17,5 kDa)
Tris	Tris (hydroxymethyl-) aminomethan

TZ	Tag der Tragzeit
TCR	T-Zell-Rezeptor

V

V-Region	Variable-Region
vgl	vergleiche

W

WC	white crossbred
----	-----------------

X

X-Gal	5-Brom-, 4-chlor-, 3-indolyl- β -(D)- Gal aktopyranosid
-------	--

Z

z. B.	zum Beispiel
-------	--------------

8.5 Curriculum vitae

Name: Wiebke Geisel
Geburtsdatum: 31.03.1974
Geburtsort: Frankfurt am Main-Höchst
Wohnort: Töplitzstr.8, 60596 Frankfurt
Staatsangehörigkeit: deutsch
Religionsbekenntnis: evangelisch
Familienstand: ledig
Mutter: Jutta Geisel, LMTA, Heilpraktikerin
Vater: Erich Geisel, Dipl.- Ingenieur
Geschwister: Olaf Geisel, verstorben
Armin Geisel, Dipl.- Ingenieur

Schul Ausbildung

1980-1984 Grundschule Kronberg
1984-1986 Förderstufe der Altkönigschule Kronberg
1986-1993 Gymnasialer Zweig der Altkönigschule Kronberg
06/1993 Abitur (Gesamtnote: 2,5)

Berufsausbildung

1993-1995 Ausbildung zur medizinisch-technischen Laborassistentin
an der staatlich anerkannten Schule für medizinische
Heilberufe Frankfurt am Main-Höchst
09/1995 Staatliche Prüfung (Note: 1,3)
12/1995 - 9/1996 Tätigkeit als LMTA im Hygiene-Institut, Abteilung Virologie
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Hochschulbildung

10/1996-06/2003 Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang
Goethe-Universität in Frankfurt am Main

09/1998	Ärztliche Vorprüfung (Note 1,0)
08/1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)
04/2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,3)
06/2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,0)

Famulaturen

08/2000	Famulatur im Fachbereich Allgemeinmedizin Allgemeinärztin Dr. med. Eser, Frankfurt am Main-Höchst
09/2000	Famulatur im Fachbereich Innere Medizin Rot-Kreuz-Krankenhaus München, Prof. Dr. med. v. Arnim
03/2001	Auslandsfamulatur im Emergency Department Wollongong, New South Wales, Australien Direktor Dr. Andrew Bezzina
08/2001	Famulatur im Fachbereich Pädiatrie in der Kinderklinik der Städtischen Kliniken Frankfurt am Main-Höchst Chefarzt PD Dr. med. L. Schrod

Praktisches Jahr

04/2002-08/2002	Chirurgie-Tertial Chirurgische Abteilung, Städtische Kliniken Frankfurt am Main-Höchst. Chefärzte: Prof. Dr. med. Stelter, Prof. Dr. med. Dittmer. Kinder-Chirurgische Abteilung, Städtische Kliniken Frankfurt am Main-Höchst. Chefarzt: Prof. Dr. med. Koltai
08/2002-11/2002	Innere Medizin-Tertial

Kantonsspital Luzern, Schweiz.

Chefärztin Prof. Dr. med. Briner, Chefarzt Prof. Dr. med.
Joss.

12/2002-03/2003

Pädiatrie-Tertial

Kinderklinik, Städtische Kliniken Frankfurt am Main-
Höchst.

Chefarzt PD Dr. med. L. Schrod

Berufliche Tätigkeit

Seit 11/2003

Ärztin im Praktikum

Clementine-Kinderhospital Frankfurt am Main

8.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die im Fachbereich Humanmedizin der Johann-Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit unter dem Titel:

**Pränatale Entwicklung des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoires des Schweins
sowie Untersuchungen zum Einfluß von Mikroorganismen auf das
postnatale $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoire**

Im Zentrum für Innere Medizin II des Universitätsklinikums der Johann-Wolfgang Goethe-Universität unter Betreuung und Anleitung von Herrn Professor Dr. med. W. F. Caspary mit Unterstützung durch Herrn Priv.-Dozent Dr. med. W. Holtmeier ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 11. Januar 2004

Wiebke Geisel